

611-013

P 31

Д. Х. ХАМИДОВ,  
А. АБДУКАРИМОВ,  
Н. Х. АБЛЯЕВА,  
А. К. МИРАХМЕДОВ

# **Р** **ЕАКЦИЯ**

**ЭМБРИОНАЛЬНЫХ  
ТКАНЕЙ  
НА ДЕЙСТВИЕ  
ГОРМОНОВ**

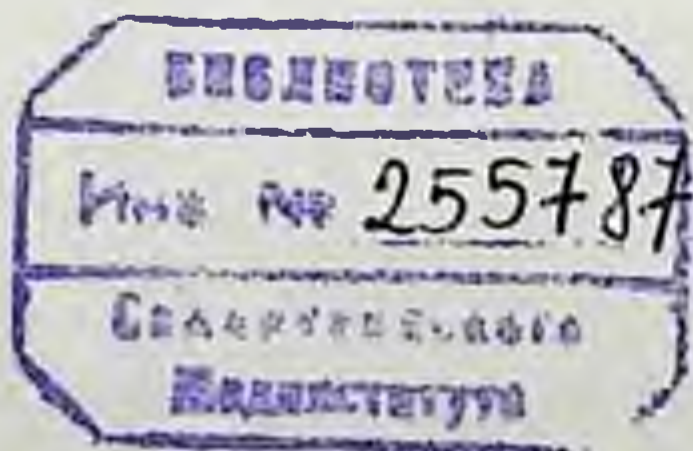
АКАДЕМИЯ НАУК УЗБЕКСКОЙ ССР  
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ

611-013

P 31

Д. Х. ХАМИДОВ, А. АБДУКАРИМОВ, Н. Х. АБЛЯЕВА,  
А. К. МИРАХМЕДОВ

РЕАКЦИЯ  
ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ТКАНЕЙ  
НА ДЕЙСТВИЕ ГОРМОНОВ



ИЗДАТЕЛЬСТВО «ФАН» УЗБЕКСКОЙ ССР

ТАШКЕНТ-1976

УДК 577.17+575.191.

Д. Х. Хамидов, А. Абдукаримов, Н. Х. Абляева,  
А. К. Мирахмедов. Реакция эмбриональных тканей на действие  
гормонов. Изд-во «Фан» УзССР. Табл.—9, рис.—49, библи.—549 назв.,  
стр.—131.

В монографии охарактеризовано участие отдельных гормонов в индукции биосинтеза нуклеиновых кислот и белков в развитии и их влияние на энергетические процессы эмбриональных митохондрий различных органов. Рассмотрены некоторые специфические рецепторы гормонов, которые играют важную роль в механизме действия их на генетическом уровне. Описаны взаимосвязь структурных и функциональных изменений митохондрий различных органов эмбриона и особенности их реакции на введение гормона.

Книга представляет интерес для биологов, биохимиков, цитологов, физиологов и медиков.

Ответственный редактор

Акад. АН УзССР Я. Х. ТУРАКУЛОВ



## ВВЕДЕНИЕ

Гормоны играют значительную роль в регуляции морфо-функциональной дифференциации клеток развивающегося организма. Роль тиреоидных гормонов в этом процессе заключается в активировании генетического аппарата ядер, усилении синтеза новых популяций РНК и активизации их трансляции. Существует точка зрения, согласно которой влияние тиреоидных гормонов на синтез белка осуществляется путем усиления митохондриальных процессов трансформации энергии и увеличения синтеза новых дыхательных ферментов в митохондриях.

Идея о генотропном действии гормонов была впервые высказана U. Clever в 1961 г. на основании данных по образованию специфических пuffed (вздутый) на гигантских хромосомах слюнных желез насекомых при действии экдизона.

В 1963 г. P. Karlson выдвинул гипотезу о механизме генотропного действия гормонов, принципиально сходную с известной гипотезой F. Jacob, J. Monod. Согласно P. Karlson, гормоны в клетках-мишенях вступают в аллостерическое взаимодействие с белком-репрессором и вызывают определенные изменения в структуре последнего. В результате репрессор отрывается от оператора и активирует оперон. Это открытие получило широкую поддержку при изучении механизма действия других гормонов.

В настоящее время подтвердилось предположение, что стероидные гормоны оказывают генотропный эффект путем образования рецепторных комплексов в цитоплазме и ядре, а в структуре интерфазного хроматина имеются акцепторные участки, связывающие эти комплексы. Молекулярно-генетические и биохимические исследования последних лет выявили, что специфические рецепторные молекулы являются продуктом гена-регулятора, а акцепторные участки хроматина — операторной частью соответствующего оперона. Однако механизм генотропного действия тиреоидных гормонов в процессе дифференцировки изучен не до конца.

Исследованиями нашей лаборатории установлена активация значительной доли генома тиреоидными гормонами, проявляющая

ся в индукции качественно новых популяций РНК, определенных фракций белков цитоплазмы и кислых белков хроматина.

Получены доказательства генотропного действия тиреоидных гормонов путем образования специфических гормон-белковых комплексов. Исследования проводились на удобной экспериментальной модели — автономно развивающихся куриных эмбрионах, а в некоторых случаях на культивируемых клетках эмбрионов человека.

В I главе монографии (авторы Д. Х. Хамидов, А. Абдукаримов), представлены данные о роли некоторых гормонов и результаты исследований генотропного влияния тиреоидных гормонов.

Важным этапом в изучении механизма действия тиреоидных гормонов явились исследования анаболического действия их на энергетический аппарат клетки, проведенные J. R. Tata et al. (1964). Было установлено, что тиреоидные гормоны увеличивают скорость включения аминокислот не только в микросомальную фракцию, но и в изолированные митохондрии, усиливают дыхание в результате активизации синтеза дыхательных энзимов в тканях.

L. Sokoloff et al. (1963) представили ряд данных об участии митохондрий в механизме влияния тиреоидных гормонов на синтез белка в клетке.

Для полного понимания участия гормонов щитовидной железы в регуляции молекулярных механизмов необходимо изучить процесс реализации внутриклеточного эффекта тироксина, осуществляемый путем активации митохондрий, что в последующем приводит к усилению трансляции нуклеиновых кислот в цитоплазме.

В задачу наших исследований входило выяснение особенностей действия тиреоидных гормонов на функционирование дыхательной цепи в митохондриях развивающегося организма.

Экспериментально полученные данные показали, что в процессе развития эмбриона осуществляется взаимосвязь между функциональной активностью щитовидной железы и становлением структуры и функции митохондрий. Тиреоидные гормоны влияют на энергетические процессы, стимулируя энерготранспортную цепь и образуя новые мембранные структуры в развивающихся митохондриях.

Во II главе книги (авторы Д. Х. Хамидов, Н. Х. Абляева, А. К. Мирахмедов) представлены литературные данные и результаты исследований авторов по становлению энергетических процессов в митохондриях различных клеток в эмбриональном развитии. Изучено начало отзывчивости, цитологические и биохимические реакции митохондрий на действие тиреоидных гормонов.

Накопленные в последнее время литературные данные и полученный нами экспериментальный материал свидетельствуют, что тиреоидные гормоны участвуют в регуляции дифференцировки клеток развивающегося организма путем непосредственного действия на генный аппарат и энергетические процессы.

В подготовке и обсуждении книги большую помощь оказали А. Т. Адылова, Т. Г. Гулямова, Т. И. Винокурова, С. Е. Мучник, Т. Ю. Шулакова и др. Авторы выражают им искреннюю признательность.



## ГЛАВА I

# МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ГОРМОНАЛЬНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ В ПРОЦЕССЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК

## УЧАСТИЕ ГОРМОНОВ В ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ КЛЕТОК

Дифференцировка клеток — последовательное запрограммированное во времени включение и выключение определенных генов, необходимых для функционирования данного организма (Нейфах, 1969). В настоящее время твердо установлено участие гормонов эндокринных желез в регуляции морфологических процессов, происходящих в дифференцирующихся клетках развивающегося организма.

Исследования по влиянию эстрогена на цитологическую и биохимическую дифференцировку эпителиальных клеток яйцевода неполовозрелых цыплят выявили, что эстроген и диэтилстилбестрол индуцируют дифференцировку цитологически и биохимически специализированных клеток. Под действием эстрогена возникают цитологически различающиеся клетки, синтезирующие овальбумин; другой тип клеток вырабатывает исключительно авидин (O'Malley et al., 1969).

Гормональная регуляция морфогенетических процессов в раннем онтогенезе исследована А. А. Войткевичем и Г. В. Нестайко (1971). В опытах удаление щитовидной железы головастика останавливало дальнейшую дифференцировку клеток нейросекреторного аппарата преоптической зоны и аденогипофиза. Удаление преоптического ядра, клетки которого синтезируют и выделяют различные тропные полипептидные гормоны, также останавливает цитодифференцировку клеток аденогипофиза, которая, как предположили авторы, регулируется непосредственно тиреоидными гормонами и опосредованно влиянием тиреоидных гормонов на состояние нейросекреторного аппарата преоптического ядра.

Гормональные взаимоотношения при регуляции морфогенетических процессов, происходящих в клетках молочной железы, хорошо демонстрирует схема (рис. 1) R. W. Turkington (1972).

Существуют доказательства присутствия в органной культуре молочных желез недифференцированных эпителиальных клеток, способных после ряда последовательных митотических делений превращаться в секреторные альвеолярные клетки. Направленное

митотическое деление стволовых недифференцированных клеток, согласно R. W. Turkington (1972), индуцируется инсулином, фактором роста эпителия, гормоном роста и подавляется эстрогеном. Однако для синтеза секреторной клеткой казеина (регулируемого пролактином) необходимо предварительное действие гидрокортизона или эквивалентного ему адренокортикоида на менее дифференцированные клетки-предшественники. Клетки, образованные при отсутствии этих гормонов, не синтезируют казеин в ответ на введение пролактина или его синергистов — инсулина и плацентального лактогена.

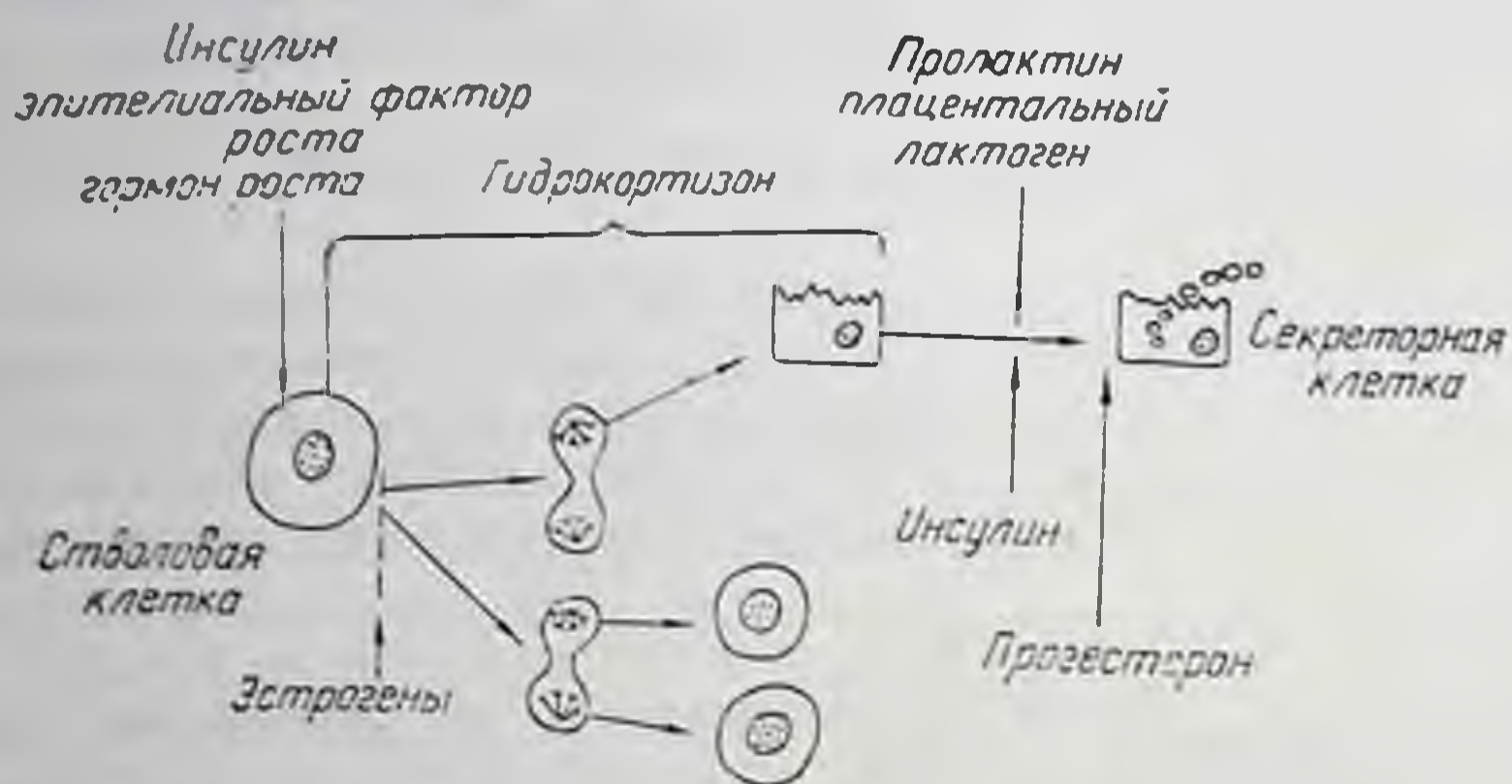


Рис. 1. Схема последовательного действия гормонов на эпителиальные клетки молочной железы при образовании секреторных клеток (Turkington, 1972).

ного лактогена. Чтобы вновь образованные дочерние клетки могли синтезировать белки молока в ответ на пролактин, необходимо предварительно инкубировать их предшественники в присутствии гидрокортизона в течение 48 час. (Lokwood et al., 1967; Turkington et al., 1967, 1968; Turkington, 1968, 1971). Инсулин и плацентальный лактоген могут выступать в этом процессе как синергисты пролактина (Turkington, 1972).

Механизмы специфического активирования генов в специфических типах клеток пока не ясны. R. W. Turkington (1972) полагает, что для различных типов клеток на разных уровнях дифференцированного развития должны быть иными и механизмы специфической регуляции генетической активности определенными гормонами. R. W. Turkington исследовал 4 модельные системы, гормон-зависимая дифференцировка которых приводится в табл. 1.

Описанные системы привлекательны тем, что при специфической гормональной индукции меняются следующие их свойства:

каждая система при действии гормонов образует высокодифференцированные специфические клетки с отчетливыми морфологическими признаками;

активирование специфического гена или генов оценивается образованием специфического белка (белков);



во всех случаях, за исключением глутаминсинтетазы, которая имеется как в клетках мозга, так и в клетках сетчатки, маркерные белки образуются только в собственных клетках:

химические сигналы (гормоны) индуцируют образование маркерных белков в эффекторных клетках;

гормоны взаимодействуют с культурой клеток и вызывают клеточную дифференцировку подобно наблюдаемому *in vivo*;

легко отличить (за исключением глутаминсинтетазы) регуляторное влияние гормона, направленное на образование маркерных бел-

Т а б л и ц а 1

Модельные системы гормонзависимой клеточной дифференцировки (по Turkington, 1971)

Система	Дифференцированная клетка	Маркерный белок	Гормональный индуктор
Сетчатка цыплят	Нейтральные клетки сетчатки	Глутаминсинтетаза	Гидрокортизон
Яйцевод цыплят	Цилиндрические железистые клетки	Лизоцим, овальбумин	Эстрогены
Костный мозг	Бокаловидные клетки	Авидин	Прогестерон
Молочная железа	Эритроциты	Гемоглобин	Эритропоэтин
	Альвеолярные клетки	Казеин, лактозсинтетаза	Инсулин + гидрокортизон + пролактин

ков и на общий синтез белка, поскольку маркерные белки являются основным продуктом синтетической активности дифференцированных клеток.

### ГОРМОНАЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ГИГАНТСКИХ ХРОМОСОМ НАСЕКОМЫХ

Данные о непосредственном генотропном действии гормонов были получены при экспериментальном исследовании механизма действия гормона линьки насекомых — экдизона. Если рассматривать гигантские хромосомы какой-либо ткани насекомых на последовательных стадиях развития организма, можно заметить, что структура многих областей хромосом изменяется в соответствии с этапом развития. Появляются ограниченные области, где хроматин дисков характерным образом разрыхляется, образуя вздутия, называемые пuffedми. Возникновение пuffedов считают показателем активности гена (или оперона), расположенного на данном участке.

Со времени открытия стадийной и тканевой специфичности пuffedов (Veerman, 1952; Veener and Pavan, 1955) изменение характера их активности описано для целого ряда двукрылых. Дальнейшими исследованиями (Veerman, 1962; Kroeger, 1964; Clever, 1968; Ashbug-



пег, 1970) был установлен феномен гормонспецифичности образования пуффов (рис. 2). Непосредственная связь между образованием пуффов и активностью гена впервые была продемонстрирована одновременным синтезом РНК и оценена по включению  $H^3$ -уридина в пуффы (Pelling, 1964). Однако эксперименты, прямо доказывающие синтез матричной РНК в пуффах, не проводились. Имеются косвенные данные о том, что при гибридизации соматических клеток *Chironomus palliduvitatus* и *Chironomus tentans* передача зоны Бальбани хромосом обуславливает синтез электрофо-



Рис. 2. Специфическая индукция пуффов в хромосоме эндизоном.

1 — пуфф 31С. 2 — пуфф 78В; а — до действия гормона; б — после действия гормона.

ретически индивидуальной белковой фракции (Grossbach, 1968). При образовании пуффов аккумулируются также кислые белки хроматина, но этот процесс протекает медленно и не блокируется ингибиторами синтеза белка. Считают, что кислые белки пуффов входят в состав рибонуклеопротеиновых гранул и участвуют в транспорте РНК из хромосомы в цитоплазму (Wyatt, 1972). Функционально эти белки близки белкам информофер.

Г. Р. Wyatt (1972) систематизировал литературные данные по влиянию экдизона на синтез РНК и белка, метаморфоз, появление или исчезновение различных морфологических признаков у большинства видов двукрылых насекомых. В табл. 2 приводятся сокращенные данные, показывающие влияние экдизона на синтез РНК и белка.

Дифференциальное образование пуффов и их исчезновение, индукция синтеза различных РНК, ферментов и их подавление наблюдаются при введении очищенного экдизона *in vivo* или при включении функции эндокринной железы, секретирующей экдизон.

Было показано, что в области индуцированного гормоном пуф-



фообразования хромосом происходит усиление синтеза ДНК и амплификация индуцированных генов (Stocker and Pavan, 1974). Однако для подтверждения специфического генотропного действия этого гормона необходимо было установить избирательное связывание радиоактивного гормона в местах его действия. Для экдизона это предположение впервые было проверено с каталитически тритированным препаратом с низкой удельной активностью. Р. Karlson et al. (1964) ввели  $H^3$ -экдизон в кукулы развивающегося *Calliphora* и через определенные промежутки времени измеряли

Таблица 2

Действие очищенного экдизона при введении насекомым

Виды, стадии развития, экспериментальное вмешательство	Эффект	Доза гормона, $\alpha$ или $\beta$ , мкг	Источник
<i>Antheriae pernyi</i> , личинка	Усиление синтеза РНК и белков	$\alpha$ , 12	T. S. Sahota, A. Mansingh, 1970
<i>Bombux mori</i> , личинка	Индукция синтеза фиброгена	$\beta$ , 2	H. Shigematsu, H. Moriyama, 1970
<i>Calleria mellonella</i> , личинка	Индукция синтеза РНК	$\alpha$ , 3	N. Patel, K. Madhavan, 1969
<i>Hyalophora cecropia</i> , куколка	Индукция синтеза РНК и белков	$\alpha$ , 10	G. R. Wyatt, B. Linzen, 1965
<i>Calliphora erythroceph</i> , личинки, наложенная лигатура	Индукция допа декарбоксилазы, усиление синтеза различных РНК и белков	$\alpha$ , 0,02 $\beta$ , 0,01	P. Karlson, G. E. Sckeris, 1962
<i>Calliphora erythroceph</i> , личинка, выжиганием удалена эндокринная железа	Усиление синтеза РНК, индукция активатора фенолоксидазы	$\alpha$ , 0,2 $\alpha$ , 0,1	P. Karlson, G. Peters, 1965 P. Karlson, A. Schweiger, 1961
<i>Calliphora stygia</i> , личинка	Усиление синтеза РНК и белков	$\beta$ , 0,002	G. J. Neufeld et al., 1968
<i>Chironomus tentans</i> , личинка	Образование пуффов в политенных хромосомах, синтез белков слюны	$\alpha$ , $2 \times 10^{-6}$ $\alpha$ , 0,1	U. Clever, 1961 U. Clever et al., 1969
<i>Drosophila hydei</i> , личинка	Образование пуффов в политенных хромосомах	$\alpha$ , $10^{-5}$	H. D. Berendes, 1967
<i>Drosophila melanogaster</i> , личинка	.	$\alpha$ , 0,02	M. Ashburner, 1970

радиоактивность в гемолимфе, эпидермисе, жировой ткани и в субклеточных фракциях. Оказалось, что гормон довольно быстро включается в эпидермис (максимум включения 60 мин.), включение в жировую ткань происходит через 4—7 час. В клетках эпидермиса гормональная метка обнаруживается преимущественно в ядерной фракции, тогда как в жировой ткани она включается в микросомную фракцию.

Применение синтетического экдизона с высокой удельной активностью позволило изучить связывание гормона автордиографическим методом (Weigich, Karlson, 1969). Получены раздавленные



препараты слюнных желез *Chironomus tentans* после введения  $H^3$ -экдизона *in vivo*. Локализация гормона на хромосомах и в ядрах была меньше по сравнению с цитоплазмой. Н. Emmerich (1969) инкубировал слюнную железу с  $H^3$ -экдизоном *in vivo* в течение 10 мин. Замораживая железу, получил сверхтонкие срезы и фиксировал их осмием. В железах, взятых в опыт за 10 час. до образования кукол, происходило отчетливое включение в ядра меченого гормона, превышающее уровень включения в цитоплазму более чем в 3 раза. В то же время в железах, взятых в опыт за 60 мин. до окукливания, ядерная локализация гормональной метки была меньше, чем в цитоплазме. Эти результаты указывают на концентрирование экдизона в ядрах на определенных стадиях развития.

Н. Emmerich (1970) получил интересные данные по связыванию  $H^3$ -экдизона с белками слюнных желез *D. hydei*. После инкубации желез личинок с меченым гормоном в течение 30—60 мин. гормональная метка была выявлена в белковых фракциях 2S и 3,6S. Если проводить инкубацию при 0°C, гормональная метка в основном обнаруживается в цитоплазме, повышение температуры до 25°C приводит к увеличению количества гормона, включающегося в ядерный экстракт, что указывает на роль метаболизма клетки в процессе транспорта гормона. Экдизонсвязывающая способность белков цитоплазмы и ядерного сока сохраняется при разделении белков гельфильтрацией и электрофорезом на полиакриламидном геле (Emmerich, 1970).

Основываясь на литературных данных, Р. Б. Хесин (1972) предположил, что отдельный ген или оперон должен быть подготовлен к ответу на гормональный индуктор, поскольку введенный в личинку дрозофилы меченый экдизон обнаруживается вдоль всех хромосом, а отвечает на него образованием пуффов, т. е. активацией синтеза РНК и накоплением кислых белков, первоначально только один или немногие участки (Leenders et al., 1970; Berendes, 1971).

Таким образом, приведенные литературные данные показывают, что гормоны линьки насекомых  $\alpha$ - и  $\beta$ -экдизон непосредственно участвуют в процессах метаморфоза, дифференциальном пуффобразовании и индукции синтеза РНК и ферментов.

Молекулярные механизмы регуляции генетической активности насекомых экдизоном станут более понятными после рассмотрения общих принципов включения и выключения определенных генов или оперонов, а также молекулярных механизмов генотропного действия гормонов у позвоночных животных.

### ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ВКЛЮЧЕНИЯ И ВЫКЛЮЧЕНИЯ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ

В молекулярной биологии важнейшими являются проблемы регуляции транскрипции, а также реализации активности генов — трансляции. Механизмы включения и выключения генов удовлетворительно изучены у микроорганизмов. На основе представлений



о механизмах включения и выключения генетической активности микроорганизмов построена известная гипотеза негативной регуляции функционирования оперона F. Jacob, J. Monod (1961), основные положения которой подтверждены многочисленными экспериментами. Так, репрессоры некоторых оперонов бактерий и вирусов уже выделены (Gilbert, Müller-Hill, 1966; Ptashne, 1967; Udaка, 1970) и оказались олигомерами, построенными из двух или четырех субъединиц (Lieb, 1969; Pigotta et al., 1970). Способность репрессора присоединяться к оператору зависит от присутствия в клетке эффекторов — низкомолекулярных веществ, являющихся чаще всего субстратами или продуктами действия ферментов, определяемых данным опероном (Gilbert, Müller-Hill, 1967).

Показано, что репрессор лактозного оперона *E. coli* претерпевает конформационное изменение в результате взаимодействия с индуктором — пропил- $\beta$ , D-тиогалактозидом. Об этом свидетельствуют изменения спектра ультрафиолетового поглощения, коэффициента седиментации и спектра кругового дихроизма репрессора (Ohshima et al., 1972). Механизм связывания *lac*-репрессора с оператором *lac*-оперона *E. coli* исследован группой ученых (Müller-Hill et al., 1972). На основании картирования большого числа трансдоминантных мутаций *lac*<sup>-</sup>, нарушающих способность связываться с опероном, но не влияющих на взаимодействие с индуктором, высказано предположение, что *lac*-репрессор связывается с оператором посредством полипептидной цепи небольшой длины, которая выпячивается на поверхности белковой глобулы репрессора. Все эти мутации затрагивали фрагмент полипептидной цепи *lac*-репрессора длиной 50 аминокислот с одного конца репрессора, соответствующего 5'-концу гена для репрессора.

Анализ последовательности этих аминокислот позволил построить молекулярную модель узнающего участка *lac*-репрессора, на основании которой предсказано, что *lac*-оператор в ДНК содержит последовательности из 8 пар нуклеотидов, повторяющихся 4 раза. Предполагается, что каждая субъединица *lac*-репрессора (она состоит из 2 или 4 субъединиц) связывается с одной из этих последовательностей. Если репрессор присоединен к оператору, то оперон репрессирован и не считывается: наблюдается негативная регуляция, постулированная F. Jacob, J. Monod. В этом случае активация оперона осуществляется в результате взаимодействия низкомолекулярных индукторов с молекулой репрессора. Образуется комплекс, не способный взаимодействовать с оператором, вследствие чего оперон активируется.

Таким образом, у бактерий включение и выключение генов индуцируются субстратами и продуктами реакции метаболизма.

Основная схема механизмов регуляции активности генов бактерий в свете новых данных приводится в обширных обзорах А. Л. Киселева (1971) и Р. Б. Хесина (1972).

У высших организмов также известна индукция синтеза ферментов субстратами, основанная на включении соответствующих генов.



Например, R. J. Salganik et al. (цит. по Хесину, 1972) показали, что скармливание крысам пищи, богатой галактозой, значительно активирует ферменты печени: галактокиназу, галакто-1-фосфатуридилтрансферазу и уридиндифосфогалактозо-4-эпимеразу. Одновременно повышается синтез разных классов РНК, а не только галактозных иРНК. Следовательно, субстрат вызывает многообразную реакцию, что отличает индукцию у животных от субстратной индукции бактерий.

Как отмечает Р. Б. Хесин (1972), у кишечной палочки синтез трех указанных ферментов определяется структурными генами, входящими в состав одного оперона; ферменты индуцируются галактозой координированно, так как образуются на общей полицистронной иРНК. В печени крыс сначала быстро активируется киназа и лишь через несколько дней другие два фермента. R. J. Salganik (цит. по Хесину, 1972) предполагает, что гены последних активируются независимо от гена киназы под действием ее продукта — D-галактозо-1-фосфата, образующегося из галактозы. Доказательство того, что рост активности ферментов обусловлен усилением синтеза их иРНК, заключается в подавлении индукции ингибиторами транскрипции — актиномицином Д и аурантином. Хотя приведенный пример указывает на возможность субстратной индукции у животных, ясно видно отличие этого механизма от того, на котором основана субстратная индукция у бактерий.

Известно несколько случаев роста активности ферментов при добавлении соответствующих субстратов к культурам клеток животных. Например, активность щелочной фосфатазы возрастает при введении фенолфосфата в среду, где культивируют фибробласты человека. Роль генетического аппарата в этом процессе подтверждается тем, что такая индукция обнаружена лишь в клетках с нормальным набором хромосом и не наблюдается в клетках, ставших гетероплоидными (Сох, McLeod, 1964). Однако нет определенных доказательств синтеза именно специфичных иРНК, определяемых структурным геном изучаемого фермента. Достаточно хорошо изученных случаев субстратной индукции у высших организмов также мало.

Р. Б. Хесин (1972) полагает, что субстратная индукция синтеза ферментов за счет активации соответствующих генов не получила у эукариотов широкого распространения, вероятно, из-за постоянства внутренней среды. Однако во многих случаях, когда новообразование ферментов индуцируется субстратами, процесс направлен именно на поддержание постоянства внутренней среды, например, при действии систем, обезвреживающих ядовитые, лекарственные и другие чужеродные вещества в печени (Хесин, 1960).

У прокариотов некоторые опероны бактерий находятся под двойным контролем: одновременно регулируются негативно репрессорами, которые при взаимодействии с субстратным индуктором перестают репрессировать оперон, и позитивно белками-активаторами. Механизм позитивной регуляции был открыт при изучении работы

оперонов кишечной палочки, определяющих синтез ферментов катаболизма углеводов: лактозы, галактозы, арабинозы и др. Белок-регулятор активируется при присоединении 3', 5'-циклической АМФ и в таком виде связывается со специфическими акцепторными участками на ДНК. Эти участки расположены в начале оперонов. Присоединение белка, находящегося в комплексе с циклической АМФ, активирует оперон (Emmer et al., 1970; Zubay et al., 1971; Eron et al., 1971; Anderson et al., 1971; Crombrughe et al., 1971; Greenblatt, Schleif, 1971).

Если концентрация циклической АМФ понижена, белок-регулятор не активирует соответствующий оперон. Таким образом, циклический АМФ — сигнальное вещество, не имеющее ничего общего ни с субстратами, ни с продуктами реакций, которые катализируют ферменты, определяемые соответствующими оперонами и, вероятно, специально выработаны для участия в процессах регуляции (Pastan, Perlman, 1971).

По-видимому, белок-регулятор (рецептор циклической АМФ) присоединяется к расположенному перед промотором специальному акцепторному участку. Для того, чтобы РНК-полимераза считывала такой оперон, необходимы два условия: отделение от ДНК репрессора под влиянием субстрата и прикрепление активатора под влиянием циклической АМФ. В начале оперона может находиться по крайней мере три акцепторных участка: для активаторного белка, РНК-полимеразы и репрессора (не исключено, что они могут перекрываться) (Хесин, 1972).

Проанализировав литературные данные по бактериям и вирусам, Р. Б. Хесин (1972) сделал ряд заключений о регуляции синтеза и РНК, которые важны для дальнейшего понимания этих процессов у многоклеточных организмов:

регуляция активности генов осуществляется негативно с помощью репрессоров, блокирующих опероны, и позитивно с помощью активаторов, стимулирующих синтез РНК в ненужных группах генов;

опероны иногда имеют более одного акцепторного участка и регулируются одновременно несколькими белками-регуляторами. Несколько оперонов могут иметь одинаковые акцепторные участки и регулироваться одним и тем же белком-регулятором;

последовательное включение генов определяется тем, что в первом опероне находится ген-регулятор следующего оперона и белок-регулятор, определяемый первым опероном, включает следующую группу генов;

все механизмы регуляции транскрипции у бактерий основаны на двух свойствах белков: способности узнавать определенные последовательности нуклеотидов в линейной двуспиральной ДНК и менять свою структуру при присоединении низкомолекулярных веществ (эффекторов), в результате чего меняется сродство белка к определенным последовательностям нуклеотидов в ДНК;



эффе́кторами, изменяющими сродство белков-регуляторов к акценторным участкам ДНК, могут быть не только субстраты и продукты соответствующих ферментов, но и специальные регуляторные или сигнальные вещества (например, циклическая АМФ).

Как было указано, у эукариотов способ субстратной индукции синтеза РНК носит эпизодический характер. Взамен субстратной индукции активности эукариотов широко распространена индукция синтеза специфических РНК и белков сигнальными веществами, индукторную роль которых успешно могут играть 3', 5'-циклическая АМФ и гормоны.

#### МЕХАНИЗМ КОНТРОЛЯ ПРОЦЕССОВ ТРАНСЛЯЦИИ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ РНК, ИНДУЦИРОВАННОЙ СТЕРОИДНЫМИ ГОРМОНАМИ

Детальные исследования действия кортикостероидов на синтез двух ферментов, катализирующих первые этапы распада аминокислот триптофана и тирозина: триптофаноксигеназы (или триптофанпирролазы, КФ 1. 13. 1. 12) и тирозинаминотрансферазы (или тирозинтрансаминазы, КФ 2. 6. 1. 5), выявили, что активность этих ферментов в печени крыс значительно возрастает (в 7—10 раз) после введения животным кортизона или гидрокортизона (Кпох, 1951; Кпох et al., 1956; Протасова, 1965; Thompson et al., 1966).

Кортикостероидная индукция наблюдалась не только при введении гормонов животным. Добавление гидрокортизона к перфузионной жидкости приводило к линейному повышению активности триптофаноксигеназы и тирозинаминотрансферазы в опытах с перфузией изолированной печени крыс (Goldstein 1962; Hager, Kenney, 1968). Добавление дексаметазона или гидрокортизона к среде, в которой культивировали клетки гепатомы, вызывало значительное повышение активности тирозинаминотрансферазы (Thompson et al., 1966; Potter et al., 1967; Reel, Kenney, 1968), а также увеличивало ее количество в 15—30 раз (Granner et al., 1968). Индукция синтеза триптофаноксигеназы кортизоном и кортизолом наблюдалась и в регенерирующей печени крыс как при введении гормонов *in vivo*, так и при добавлении их к среде перфузии в опытах с изолированной печенью (Goldstein, Кпох, 1963).

Н. А. Юдаев и Т. Н. Протасова (1971), анализируя имеющиеся сведения о гормональной индукции тирозинаминотрансферазы, пришли к выводу, что гормональный механизм регуляции этого фермента появляется лишь на определенной стадии эволюционного развития. Индукция синтеза этих ферментов кортикостероидами доказана как иммунохимическим методом (Granner et al., 1968), так и по увеличению включения меченых аминокислот в растворимые белки печени и ферменты (Segal, Kim, 1963; Jervel, 1963; Leon, 1966).

Индукция синтеза триптофаноксигеназы и тирозинаминотрансферазы подавляется при введении животным ингибиторов транс-



крипции актиномицина Д (Jervel, 1963; Greengard, Gordon, 1963). Показано, что введение кортикостероидов сильно повышает синтез всех классов РНК в печени крыс (Gaggen, 1964).

Примечателен тот факт, что гормональное действие на синтез РНК и белка может быть разобщенным в различных экспериментальных системах. У новорожденных крыс введение глюкокортикоидов до 13 дня после рождения стимулирует синтез тирозинаминотрансферазы так же, как и у взрослых, но не влияет на синтез РНК (Bagnabei, 1966). В культивируемых клетках печени (Gelehrter, Tomkins, 1967) и в органной культуре взрослой печени (Wicks, 1968) гормональная индукция тирозинаминотрансферазы не связана с увеличением синтеза РНК. При индукции глюкокортикоидами аланинотрансферазной активности в трансплантированных лимфосаркомах синтез РНК значительно ниже нормы (Nichol, Rosen, 1964).

Доказано, что некоторые стероидные гормоны индуцируют синтез специфических белков, регулируя посттранскрипционные этапы синтеза белка. Такое заключение впервые было сделано в результате наблюдений парадоксального увеличения под действием кортизола индуцированного синтеза триптофаноксигеназы в печени крыс после подавления синтеза РНК (Gaggen et al., 1964).

Для изучения первичного действия гормонов на клетку были проведены исследования на простых *in vitro* моделях, поскольку интактное животное является громадным комплексом экспериментальных систем. Одной из простых систем, пригодных для исследования гормональной индукции ферментов глюкокортикоидами, является НТС клетки — линия клеток гепатомы печени, культивируемой длительное время (Thompson et al., 1966). Эти клетки по биохимическим и морфологическим признакам не отличаются от нормальных клеток печени, но более значительно индуцируют тирозинаминотрансферазу при действии кортикостероидов (Tomkins et al., 1966). Введение глюкокортикоидов стационарным или растущим культурам НТС клеток вызывает 5—15-кратное увеличение скорости синтеза тирозинаминотрансферазы, которая сохраняется, пока имеется индуцирующий стероид, и падает при удалении гормона (Gaggen et al., 1970). Однако если синтез РНК подавить в полностью индуцированных клетках (т. е. на максимуме гормональной индукции) актиномицином Д, который предотвращает транскрипцию, синтез тирозинаминотрансферазы остается на максимальном уровне индукции в течение нескольких часов (Tomkins et al., 1970), т. е. синтез фермента становится конститутивным, даже если удалить гормональный индуктор. Эти результаты натолкнули на мысль, что для подавления индукции синтеза белка (деиндукции) необходим синтез РНК.

На необходимость синтеза РНК для снятия гормональной индукции синтеза тирозинаминотрансферазы указывает также то, что полное подавление синтеза РНК высокими концентрациями актиномицина Д приводит к парадоксальному увеличению скорости син-



теза фермента — супериндукции (Thompson et al., 1970). Было сделано предположение о наличии лабильного посттранскрипционного репрессора, деградирующего и подавляющего трансляцию информационной РНК. Стероид-рецепторный комплекс является антагонистом этих действий гипотетического репрессора трансляции. Согласно этой гипотезе, синтез тирозинаминотрансферазы контролируют по крайней мере три гена: 1) собственный структурный ген; 2) ген для репрессора; 3) ген для цитоплазматического рецептора.

На основании исследований составлена схема посттранскрипционной, регуляции специфической генной активности (Tomkins, Gelehr-

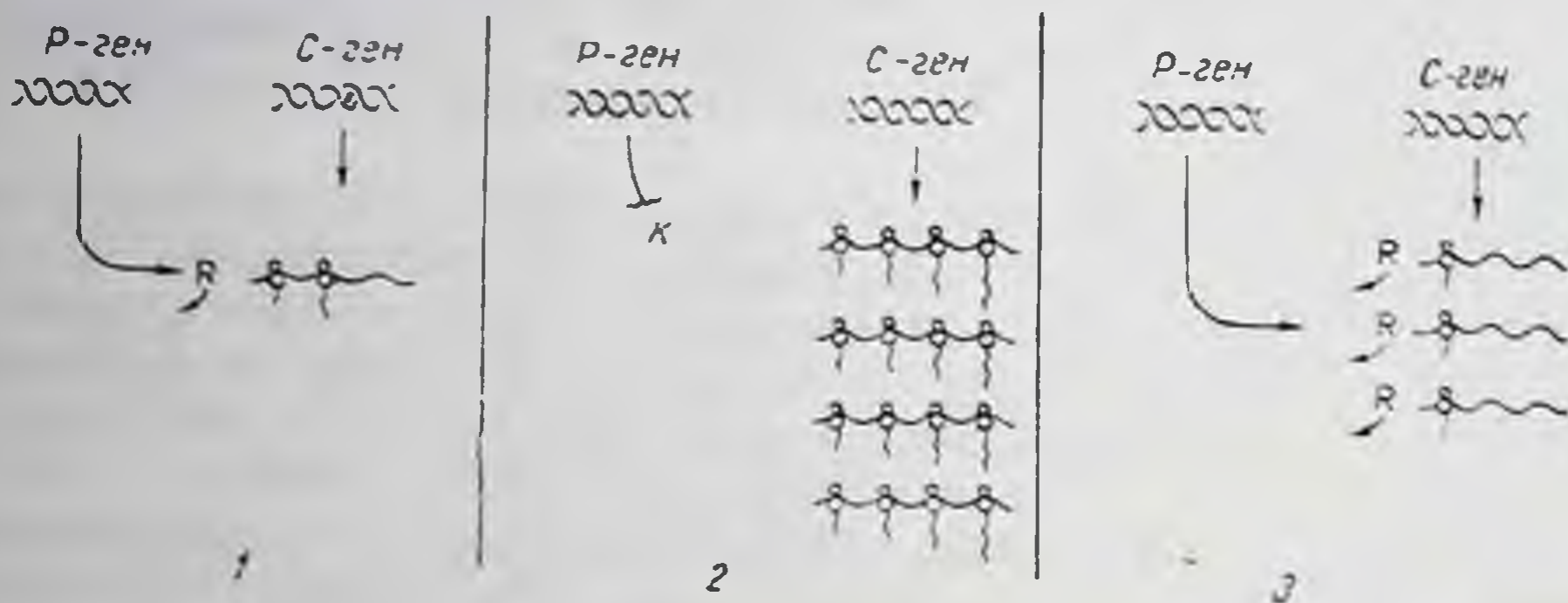


Рис. 3. Посттранскрипционная регуляция специфической генной активности.

1—исходное состояние, 2—индукция, 3—деиндукция; К—стероид-рецепторный комплекс.

ter, 1972) (рис. 3). В схеме приводятся три состояния генетической активности. В основном состоянии структурный ген синтезирует иРНК для индуцируемого фермента, а регуляторный ген синтезирует лабильный посттранскрипционный репрессор (R), который блокирует трансляцию иРНК и способствует ее распаду. В состоянии индукции кортикостероид взаимодействует со специфическим рецептором. Гормон-рецепторный комплекс блокирует синтез или подавляет действие репрессора. Это приводит к накоплению специфической иРНК и увеличению ее трансляции.

В состоянии деиндукции, при котором индуктор удален из системы, репрессор трансляции может снова функционировать и блокировать трансляцию специфической иРНК, а также способствовать ее распаду.

Механизм посттранскрипционной регуляции специфической иРНК, синтез которой был индуцирован введением прогестерона, также соответствует схеме G. M. Tomkins. Одновременное введение прогестерона и актиномицина Д приводит к сильному подавлению синтеза авидина (90%) в яйцеводах цыплят, но не влияет на общий синтез белка (O'Malley et al., 1969). Если актиномицин Д вводить на максимуме индукции, т. е. через 6 час. после введения проге-



стерона, наблюдается феномен супериндукции синтеза авидина (O'Malley and McGuire, 1968). По-видимому, в данном случае актиномицин Д подавляет синтез иРНК, кодирующий цитоплазматический репрессор трансляции.

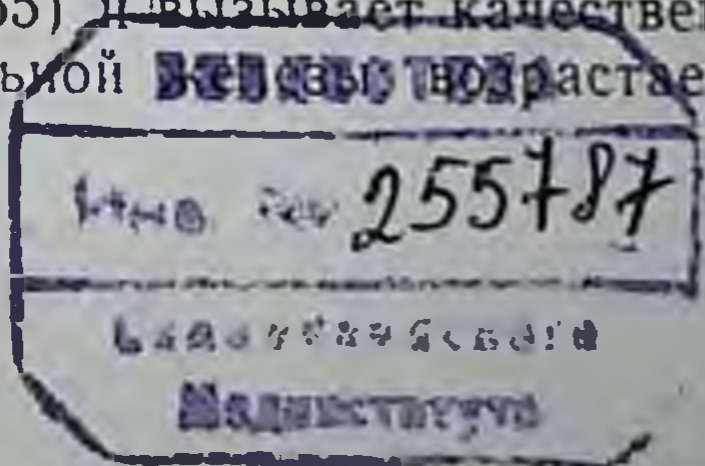
### КОНТРОЛЬ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНОВ СТЕРОИДНЫМИ ГОРМОНАМИ

Установлено, что под влиянием введения кортикостероидов происходит увеличение количества ядерной РНК, предшествующее индукции ферментов. Оказалось, что стероиды вызывают повышение количества трех типов РНК: ядерного предшественника рибосомальной РНК, быстрометящейся ДРНК и транспортной РНК (Kenney et al., 1965). Об этом свидетельствуют также данные И. М. Константиновой и В. М. Воробьева (1970).

Особый интерес представляет влияние кортикостероидов на синтез информационных РНК, кодирующих синтез ферментных белков. Введение кортизола крысам вызывало увеличение количества и перераспределение пиков во фракции РНК печени, состав оснований которой был сходен с таковым ДНК и которая, по мнению авторов, обнаруживала свойства иРНК (Lang, Sekeris, 1964; Kidson, Kirby, 1964). Эта фракция РНК обладала следующими свойствами иРНК: имела высокую скорость обмена, ДНК-подобный состав оснований, была способна стимулировать включение аминокислот в бесклеточной белоксинтезирующей системе.

Доказательством гормональной индукции иРНК является способность этой фракции к прямому синтезу специфического белка. Такого рода данные представлены в работе N. Lang et al. (1968). Авторы показали, что после введения кортизола в печени крыс усиливается синтез иРНК, отвечающий за синтез тирозинаминотрансферазы, причем образование этой иРНК начинается уже через 30 мин. после введения гормона. Выделенная ими фракция РНК стимулировала синтез тирозинаминотрансферазы и включение  $C^{14}$ -лейцина в белок в бесклеточной системе. Фракция сохраняла свою матричную активность после обработки трипсином и повторной экстракции фенолом, что говорит об отсутствии в ней тирозинаминотрансферазы. Добавление к инкубационной системе пурамицина и эритромицина, а также исключение аминокислот резко снижало образование фермента. Приведенные данные показывают, что введение кортизона животным стимулирует образование и накопление иРНК для тирозинаминотрансферазы. Под влиянием кортикостероидов увеличивается также синтез рибосомальной РНК (McGregor, Mohler, 1967), полисомных агрегаций (Bainabei, Ottolenghi, 1968) и транспортных РНК (Jervell, Osnes, 1964).

Введение животным других стероидов, например, тестостерона приводит к значительной стимуляции синтеза РНК в тканях-мишенях (Kenney, 1965) и вызывает качественные изменения в составе РНК представительной ~~ВЕСЕВО~~ возрастает частота динуклеотидов,





содержащих гуанозин и цитидинмонофосфаты, и уменьшается частота динуклеотидов, содержащих аденозин и уридинмонофосфаты (Покровский, Юдаев, 1969). Как и в опыте с кортикостероидами, введение андрогенов повышает активность РНК-полимеразы (Williams-Ashman, 1965), что подтверждается исследованиями S. Liao et al. (1965). В их опытах введение андрогенов за несколько часов до забоя сильно влияет на РНК-полимеразную активность ядер клеток вентральной простаты (табл. 3).

Исследованиями S. Liao, H. G. Williams-Ashman (1962) установлено, что быстрое увеличение синтеза ядерной РНК после введения андрогенов сопровождается увеличением синтеза цитоплаз-

Т а б л и ц а 3

Действие тестостерона на РНК-полимеразную активность (%) ядер печени, тимуса и вентральной простаты крыс (Williams-Ashman and Reddi, 1972)

Источник ядер	РНК-полимеразная активность кастрированных крыс, $M \pm m$	
	контрольных	обработанных тестостероном
Вентральная простата	16,7 ± 0,8	30,4 ± 0,0
	2,6 ± 0,3	4,8 ± 0,7
Тимус	7,8 ± 0,9	7,0 ± 1,2
	1,5 ± 0,6	2,0 ± 0,8
Печень	58,2 ± 10,5	52,9 ± 4,1
	11,1 ± 2,4	9,7 ± 1,8

Примечание. В 1-й строке — определение в полной среде инкубации; во 2-й — то же + актиномицин.

матических белков, которому предшествует увеличение количества новых цитоплазматических рибосом, рРНК и иРНК.

Интересные данные получены в серии исследований Н. А. Юдаева и Б. В. Покровского (1969, 1970, 1971, 1972, 1974). Ими было установлено, что при индукции гипертрофии матки крыс тестостероном характер синтезирующихся РНК отличается от такового при индукции женским половым гормоном — эстрадиолом. В частности, значительные различия были обнаружены в кинетике включения меченых предшественников в ядерную РНК матки и в транспорте быстрометящейся РНК ядра в цитоплазму. Фракционирование быстрометящейся ядерной РНК матки в градиенте плотности сахарозы с использованием двойной импульсной метки показало значительное несовпадение седиментационных характеристик РНК из андрогенизированной и эстрогенизированной матки. Недавно, применяя разнообразные методы гибридизации ДНК-РНК, эти авторы еще раз подтвердили выдвинутую ими гипотезу о независимом дей-

ствии тестостерона на генетический аппарат матки (Юдаев, Покровский, 1974).

В литературе имеются многочисленные доказательства участия андрогенов в усилении ДНК-полимеразной активности (табл. 4). Этот вопрос хорошо освещен в обзоре Н. G. Williams-Ashman, A. H. Reddi (1972).

Эстрогены также индуцируют синтез РНК. Установлено увеличение матричной активности хроматина матки животных как после введения эстрадиола (Dahmus, Bonper, 1965), так и при инкубации хроматина с эстрадиолом *in vitro* (Barker, Waggen, 1967). Актив-

Таблица 4

Действие андрогенов на ДНК-полимеразную активность ядер (Williams-Ashman, Reddi, 1972)

Экспериментальное вмешательство	Дни после кастрации	Кол-во дней действия тестостерона	Характеристика вентральной простаты крыс				Активность ДНК-полимеразы (рМ и АМФ $C^{14}$ час/100 мкг эквивалентная тканевой ДНК)		
			общий вес, мг/100 г веса тела	общая ДНК, мкг/100 г веса тела	общая РНК, мкг/100 г веса тела	РНК/ДНК	растворимая	ядерная	общая
Норма	0	0	128	276	661	2,4	180	123	303
Кастрация	7	0	20	85	50	0,6	48	6	54
Кастрация + тестостерон	9	2	41	106	192	1,8	300	24	324
	12	5	84	192	368	1,9	3380	166	4046
	16	9	121	255	571	2,2	191	202	393
	19	12	188	315	835	2,7	157	165	322
	0	2	184	368	1130	3,1	250	220	470
Норма + тестостерон	0	5	203	362	910	2,5	484	110	594
	0	12	251	372	1200	3,2	279	138	417

ность РНК-полимеразы увеличивается в ядрах матки крыс, получавших эстрадиол (Nicolette et al., 1968) и в ядрах молочной железы мышей при беременности (Turkington, 1969).

Методом определения частоты встречаемости близлежащих нуклеотидов и молекулярной гибридизации ДНК-РНК установлено появление новых видов РНК в матке и печени кроликов после введения эстрогена (Teng and Hamilton, 1968; Church, McCarthy, 1970).

Много новых данных о механизме действия эстрогенов на синтез специфических РНК получено при использовании в качестве модели яйцевода неполовозрелых цыплят. Отчетливо показано, что эстрогены индуцируют синтез общих белков, яичного альбумина, лизоцима, а прогестерон — авидина (O'Malley, Kohler, 1967; O'Malley et al., 1969).



Индукции синтеза белков предшествовало значительное увеличение активности РНК-полимеразы, которое наступало уже через 12 час. после введения эстрогенов (McGuire, O'Malley, 1968), в то время как синтез специфических белков возрастал в течение нескольких дней. Подобная разобщенность синтеза РНК и белка хорошо согласуется со схемой посттранскрипционного гормонального контроля матричной активности индуцированной специфической иРНК, приведенной на рис. 3.

При анализе нуклеотидного состава РНК, синтезированной *in vitro* в присутствии хроматина, выделенного из яйцевода цыплят, не получавших или получавших в течение 6 дней синтетический эстроген диэтилстилбестрол, было определено, что введение эстрогена увеличивает частоту динуклеотидов, содержащих аденин, и снижает частоту динуклеотидов, содержащих цитозин (O'Malley et al., 1969). Очевидно, эстрогены и прогестерон изменяют матричную активность хроматина, следствием чего является ускорение синтеза определенных видов РНК, в частности иРНК и тРНК. Прямое увеличение матричной активности хроматина, предшествующее синтезу авидина, было обнаружено через 2—4 час. после введения прогестерона. В этом случае, как и после введения диэтилстилбестрола, наблюдалось качественное изменение частоты пар динуклеотидов в РНК. Методом гибридизации молекул ДНК-РНК в условиях конкурирования различных популяций РНК за комплементарное взаимодействие с последовательностями ДНК выявлены новые популяции РНК в клетках яйцевода.

В результате тестирования диэтилстилбестролом и прогестероном индуцированной иРНК в бесклеточной белоксинтезирующей системе из ретикулоцитов кролика было показано, что эти иРНК направляют соответственно синтез овальбумина и авидина. Следовательно, диэтилстилбестрол индуцирует синтез овальбуминовой, а прогестерон — авидиновой информационной РНК (Chan, Means O'Malley, 1973).

Исследованиями по гибридизации в растворе при избытке РНК было показано, что гормоном индуцируемая РНК гибридизируется с уникальными последовательностями транскрибируемой ДНК (Liagakos, Rosen, O'Malley, 1973), а транскрибируемые последовательности генома клеток яйцевода не амплифицируются при введении эстрогена и прогестерона (Rosen et al, 1973).

Краткий обзор литературных данных показывает, что как кортикостероиды, так и половые стероиды повышают синтез трех типов РНК, увеличивая матричную активность хроматина и активность РНК-полимеразы. Наряду с общим усилением синтеза РНК гормоны способны индуцировать синтез информационной РНК, которая в бесклеточной системе направляет синтез специфического белка или фермента.

## КОНТРОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ТИРЕОИДНЫМИ ГОРМОНАМИ

### Влияние тиреоидных гормонов на индукцию синтеза различных белков и ферментов

В 1951 г. было установлено снижение скорости включения меченых аминокислот в белки печеночных срезов тиреоидэктомированных крыс. После вскармливания тиреоидэктомированных крыс высушенными препаратами щитовидной железы (заместительная терапия) включаемость меченых аминокислот в белки увеличивалась до нормального уровня (Du Toit, 1951).

Ряд исследователей (Sokoloff, Kaufmann, 1959, 1961; Sokoloff et al., 1963, 1963 a, 1964) подтвердили данные С. Н. Du Toit и продолжили исследования на бесклеточных препаратах печени контрольных и получавших тироксин крыс. Установлено, что сниженная скорость синтеза белка при хронической тиреоидной недостаточности нормализуется при введении крысам тироксина, тогда как введение его интактным животным стимулирует включение аминокислот в бесклеточные препараты печени.

L. Sokoloff и S. Kaufmann (1959, 1961) исследовали также влияние добавленного *in vitro* тироксина на синтез белка в отдельных фракциях бесклеточного печеночного гомогената. Авторы определили, что начиная с концентрации  $1 \cdot 10^{-7}$  М тироксина скорость синтеза белка в микросомной фракции гомогената возрастает. С увеличением концентрации гормона процент прироста радиоактивности белка повышается. Однако при добавлении тироксина в количествах, превышающих  $4 \cdot 10^{-4}$  М, направленность эффекта гормона резко меняется, стимуляция переходит в угнетение скорости синтеза белка (Sokoloff, Kaufmann, 1961):

Концентрация тироксина, М	Изменение удельной активности белка, %
$1,3 \cdot 10^{-7}$	+4
$6,6 \cdot 10^{-7}$	+5
$1,3 \cdot 10^{-6}$	+9
$1,3 \cdot 10^{-5}$	+17
$6,5 \cdot 10^{-5}$	+42
$1,3 \cdot 10^{-4}$	+61
$3,9 \cdot 10^{-4}$	+77
$6,5 \cdot 10^{-4}$	+62
$1,3 \cdot 10^{-3}$	-85

В зависимости от дозы тиреоидных гормонов, введенных животным *in vivo*, наблюдается двунаправленный эффект (активирующий и тормозящий) на клеточную белоксинтезирующую систему. Об этом свидетельствуют данные Я. Х. Туракулова, С. К. Халикова и О. С. Саитмуратовой (цит. по Гагельгансу, 1972), проводивших опыты по перекрестной реконструкции рибосом и полисом нормальных (Рн и Пн) и опытных (Ро и По) животных, получавших сти-



мулирующие и токсические дозы тироксина с клеточным соком нормальных (КСн) и опытных (КСо) животных.

Существенно, что активация или подавление включения  $C^{14}$ -тирозина в исследуемой системе наблюдается в присутствии как  $P_0$  и  $P_0$ , так и КСо, причем направленность эффекта зависит только от дозы тироксина и усиливается в интервале 1—7 дней после введения его.

Из литературных данных известно, что введение в организм тироксина или трийодтиронина сопровождается увеличением концентрации некоторых ферментов окисления. Наиболее ярким примером является увеличение концентрации митохондриальной  $\beta$ -глицерофосфатдегидрогеназы в некоторых органах крыс, получавших тиреоидные препараты (Lagdy et al., 1960; Lee et al., 1959). Добавление к рациону крыс высушенной щитовидной железы (6 раз в течение 10 дней) увеличивало скорость окисления L-глицерофосфата митохондриями тканей этих животных. Тиреоидэктомия приводила к практически полному исчезновению ферментов из митохондрий печени и почек. Заместительная терапия восстанавливала и повышала сверх нормы содержание этой дегидрогеназы. Количество ферментов, хотя и в меньшей степени, изменялось также в миокарде и в скелетной мускулатуре. Однако в тех органах, которые не реагируют на тироксин повышением потребления кислорода (мозг, селезенка, легкие, яичники и семенники), не удалось отметить изменения содержания L-глицерофосфатдегидрогеназы. Тот факт, что в данном случае речь идет об истинном новообразовании ферментного белка, подтверждается этиониновой блокадой эффекта тироксина.

Тесная связь между потреблением кислорода и содержанием в митохондриях цитохрома С иллюстрируется также данными R. A. Whaley et al., (1959). Индуцированный тиреоидными гормонами подъем активности многих ферментативных процессов, бесспорно, обусловлен увеличением количества ферментов, а не изменениями каталитической активности фермента или доступности субстрата ферменту. Наиболее четко это продемонстрировано для сукцинатдегидрогеназы, цитохромов С, В, А, (НАД)-изоцитратдегидрогеназы,  $\beta$ -глицерофосфатоксидазы и т. д. (Tata, 1964; Kadenbach, 1966; Kleitke, Wollenberger, 1968; Schäfer, Nägel, 1968).

Для разделения эффектов тиреоидных гормонов на каталитическую активность фермента и количество фермента можно использовать прямое определение содержания последнего, например, в случае цитохромов (Kadenbach, 1966), или же применять ингибитор синтеза белка (Böttger et al., 1970). Использование последнего метода позволило показать, что стимуляция тиреоидными гормонами активности ряда ферментов, участвующих в метаболизме глюкозы, является следствием возросшего синтеза молекул ферментов.

Интересные данные о влиянии тироксина на синтез гемоглобина получены R. L. Krause, L. Sokoloff (1967). Тироксин, добавляемый в концентрации  $6,6 \cdot 10^{-5}$  М к системе лизата ретикулоцитов кролика,



стимулировал полный синтез  $\beta$ -цепей гемоглобина, причем эффект был особенно выражен на стадии терминации. В случае синтеза  $\alpha$ -цепи тироксин стимулировал завершение цепей, синтез которых начат *in vivo*, но не влиял на инициацию новых цепей.

Многочисленные литературные данные указывают на два основных подхода в исследовании и два направления в интерпретации экспериментальных данных по регуляции процессов синтеза белка тиреоидными гормонами. Согласно одной из точек зрения, которой придерживаются F. H. Welt (1959), L. Sokoloff (1963, 1968), F. L. Hoch (1967, 1968), P. Cohen (1969), регуляция синтеза белка тиреоидными гормонами осуществляется посредством первичного действия этих гормонов на митохондриальные процессы переноса электронов и трансформации энергии (Гагельганс и др., 1972), а также путем первичного действия их на митохондрии, при котором из митохондрий выделяется некое соединение, непосредственно активирующее синтез белка (Sokoloff, 1963, 1968).

L. Sokoloff et al. (1963), исследуя синтез белка в реконструированном гомогенате, при котором митохондрии, микросомы и клеточный сок контрольных и подопытных животных (тиреоидэктомированных и гипертиреодных) были объединены во всевозможных сочетаниях, обнаружили, что ускорение синтеза белка происходит лишь в тех гомогенатах, которые содержали митохондрии, полученные из печеночной ткани крыс с гипертиреозом; происхождение других фракций реконструированного гомогената не имело значения. При исключении митохондрий из гомогената тироксин, введенный *in vitro*, не влиял на включение аминокислот в белок. Латентный период действия тироксина на синтез белка в этой системе составляет 5—7 мин. Это указывает на то, что контакт молекулы тиреоидного гормона с энергопродуцирующими органеллами клетки является необходимым условием увеличения трансляционной активности клеточных рибосом. Авторы полагают, что во время латентного периода действия тироксина взаимодействуют гормон и митохондрии, в результате чего в супернатант переходит некое соединение, уже непосредственно активирующее синтез белка в рибосомах. Показано, что этот фактор представляет собой диализуемое, термостабильное и разрушающееся в сильно кислой среде вещество (Sokoloff, 1968).

Однако W. G. Carter et al. (1971) показали, что в отсутствие митохондрий тироксин способен стимулировать синтез белка в бесклеточной системе. Использованная ими система содержала высокую концентрацию  $Mg^{2+}$ , незначительное количество микросом, обшемеченый L- $C^{14}$ -валин с очень высокой удельной активностью.

L. Sokoloff, P. A. Roberts (1974) указали на некоторые недостатки метода, примененного в исследовании W. G. Carter et al. (1971). В частности, эффект тироксина *in vitro* не выявляется с тРНК- $C^{14}$ -аминокислотой, если эту форму использовать как источник меченых аминокислот. Включение L- $C^{14}$ -валина в системе W. G. Carter et al. не подавляется циклогексемидом, пурамицином или РНК-азой, на-



против, четче проявляется в их присутствии. Эффект не подавляется при разведении метки избытком немеченой аминокислоты. Хроматографический анализ гидролизата меченых белков, синтезированных в присутствии тироксина в системе W. G. Carter et al., выявил отсутствие включения и загрязнение L-C<sup>14</sup>-валином. Очистка C<sup>14</sup>-аминокислоты ионообменной хроматографией перед использованием уменьшает или вовсе предотвращает эффект тироксина в отсутствие митохондрий. Эти данные указывают на необходимость митохондрий при стимуляции тироксином синтеза белка *in vitro*.

Анализируя имеющиеся литературные данные и сопоставляя их с собственными исследованиями, А. И. Гагельганс (1972) пришел к выводу, что за исключением роли этих гормонов в метаморфозе головастиков, исследованных J. R. Tata et al. (1967—1971), в подавляющем большинстве случаев митохондриальные структуры являются первичной мишенью действия тироксина и трийодтиронина, а регуляция синтеза белка тиреоидными гормонами осуществляется посредством гормональной трансформации энергии митохондрий.

Согласно альтернативной точке зрения, регуляция синтеза белка тиреоидными гормонами осуществляется не разобщением окислительного фосфорилирования, а главным образом, влиянием трийодтиронина и тироксина на новообразование рибосом, на синтез рибосомной РНК и быстрометящейся ядерной ДНК подобной РНК (Tata, 1964, 1965, 1967, 1968, 1970; Tata, Widnell, 1966).

Дальнейшие исследования касались той исключительной роли тиреоидных гормонов, которая сводится к регуляции процессов метаморфоза головастиков. Следует различать два функционально взаимосвязанных процесса при изучении регуляции тиреоидными гормонами синтеза белка:

1) индукция синтеза новых ферментов и структурных белков, которая обусловлена прямым действием тиреоидных гормонов на структуры генетического аппарата клетки и осуществляется посредством транскрипции специфических молекул информационных РНК;

2) усиление синтеза белка на матрицах, имеющих в клетках наборов и РНК, опосредованное влиянием тиреоидных гормонов на функции и структуру митохондрий.

В настоящее время в лабораториях Я. Х. Туракулова и Д. Х. Хамидова проводятся исследования по взаимосвязи этих процессов в регуляции синтеза белка тиреоидными гормонами.

Индукция синтеза белка ферментов и структурных белков тиреоидными гормонами играет важную роль в механизме действия этих гормонов. Как было отмечено, считается полностью доказанной тироксиновая и трийодтирониновая индукция синтеза митохондриальной  $\beta$ -глицерофосфатдегидрогеназы в различных тканях животных (Lee et al., 1959; Lagdy et al., 1960).

В опытах на бесхвостых амфибиях установлено, что тироксин и трийодтиронин индуцируют синтез *de novo* кислой фосфатазы,



цитохромоксидазы, ферментов орнитин-мочевинного цикла (Delsol et al., 1966; Cohen, 1970), а также индуцируют метаморфоз.

Не подлежит сомнению индукция синтеза карбамилфосфатсинтетазы в печени головастика при содержании их в среде, где присутствуют физиологические дозы трийодтиронина (Cohen, 1970).

При введении трийодтиронина головастикам наблюдается интересное явление: гормон вызывает синтез *de novo* гемоглобина, свойственного лягушке, и репрессирует синтез полипептидной цепи другого гемоглобина, характерного для личинки (Moss, Ingam, 1965). Наблюдаемый феномен можно трактовать иначе: образование «взрослого» гемоглобина и подавление «личиночного» является результатом индуцированного метаморфоза целого организма, а не непосредственного действия тиреоидных гормонов. Однако это возращение опровергается опытами на культурах эритроцитов головастика. Введение тироксина обуславливает появление нового, «взрослого» типа эритроцитов, синтезирующих «взрослый» гемоглобин и вызывает редукцию клеточного клона, образующего «личиночный» гемоглобин неметаморфозирующих личинок (Moss, Ingam, 1965).

Предположительно дифференцировка новой генерации эритроцитов связана с изменениями в синтезе РНК. Е. М. McMahon, W. de Witt (1968) показали, что после введения тироксина синтез РНК в эритроцитах снижается, а затем резко повышается. Одновременно изменяется и характер синтезирующегося гемоглобина. Следовательно, гормон щитовидной железы угнетает синтез личиночного гемоглобина, индуцируя образование дефинитивного, путем стимуляции синтеза новой РНК и дифференцировки нового типа клеток.

Исследования, проведенные в нашей лаборатории на куриных эмбрионах, выявили, что спектр белков цитоплазмы 17-дневных нормальных эмбрионов, получивших на 8-й день развития 4 мг 6-метилтиоурацила, который подавляет функцию щитовидной железы, предотвращая йодирование тиреоглобулинов (Мицкевич, 1957), значительно изменяется при электрофорезе на полиакриламидном геле. В то же время введение физиологической дозы тироксина на 14-й день развития эмбрионов, которым на 8-й день был введен 6-метилтиоурацил, приводит к восстановлению белкового спектра цитоплазмы до нормы.

Выключение функции щитовидной железы в момент ее становления приводит к исчезновению белковых дисков как в альбуминовой, так и в глобулиновой фракциях, введение же L-тироксина на фоне действия 6-метилтиоурацила приводит к восстановлению этих белковых фракций. Следовательно, указанные белковые фракции печени куриных эмбрионов являются тироксинзависимыми.

Выбор куриных эмбрионов в качестве экспериментальной модели для исследования гормональной регуляции синтеза белков



и нуклеиновых кислот в процессе развития имеет ряд преимуществ:

в процессе эмбрионального развития происходит интенсивное образование морфогенетических структур, регулируемых тем или иным гормоном (Войткевич, Нестайко, 1971; O'Malley, 1969; Tata 1970);

четко установлены сроки закладки и функционирования различных эндокринных желез, например, закладка клеток щитовидной железы происходит на 8-й день, а выделение тиреоидных гормонов в кровяное русло спустя 10,5 суток (Мицкевич, 1957, Хамидов и др., 1974);

у куриных эмбрионов отсутствует плацента и развитие происходит автономно, не зависит от состояния материнского организма.

В литературе широко освещена роль кислых белков хроматина, как единственно вероятной молекулы, способной обеспечивать многообразное выражение включения и выключения активности генов в процессе клеточной дифференцировки эукариотов (Teng et al., 1970, 1971; Spelsberg et al., 1971; Shea, Kleinsmith, 1973; Sanders et al., 1973; Wilson, Spelsberg, 1973; Thomopoulos et al., 1974; и др.). По сравнению с гистонами кислые белки предпочтительнее по ряду причин: они состоят из невероятно большого, по сравнению с гистонами, количества индивидуальных низкомолекулярных белков; применение различных методов электрофоретического анализа дает различные количества кислобелковых фракций (от 7—8 до 26—30); кислые белки обладают тканевой специфичностью, их синтез индуцируется гормонами и качественный состав меняется в процессе дифференцировки (Wilson, Spelsberg, 1973).

Изменение количества и качества негистоновых белков может происходить как в процессе клеточного цикла, так и в процессе клеточной дифференцировки. Например, G. S. Bhogjee, T. Pederson (1972) показали, что количество электрофоретических дисков кислых белков меняется на различных стадиях клеточного цикла синхронизированных клеток Hela. На различных стадиях клеточной дифференцировки *Physarum polycephalum* также меняется спектр кислых белков, анализируемый методом полиакриламидного гель-электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия (Le Sturgeon and Rush, 1973). Кроме того, некоторые кислые белки обладают ферментативной активностью гистоновых ацетилтрансфераз, деацетилаз, киназ и метилаз, а также РНК-полимераз, ДНК-полимераз и др. (Wang, 1967; Howk, Wang, 1969; Katiyama et al., 1972; Vidali, et al., 1972).

Мы изучали влияние тиреоидных гормонов на спектр кислых белков хроматина печени и мозга куриных эмбрионов при выключении функции щитовидной железы 6-метилтиоурацилом и тиомочевинной и при введении тироксина на фоне действия анти тиреоидных веществ. Степень выключения функции щитовидной железы

контролировали как биохимическими, так и морфологическими методами, разработанными в нашей лаборатории. Кислые белки хроматина выделяли по методу G. S. Bhogjee, T. Pederson, 1972, а поликриламидный электрофоретический анализ в системе буферов с додецилсульфатом натрия проводили по модифицированному нами методу D. M. Neville, 1971 (рис. 4).

Как видно из представленной на рис. 4, а схемы электрофореграмм кислых белков хроматина клеток мозга 15-дневных куриных эмбрионов, примененный нами метод разделения позволяет обнаружить 33 фракции кислых белков. При параллельном анализе кислых белков хроматина мозга эмбрионов, у которых функ-



Рис. 4. Тканеспецифичность и индуцибельность кислых белков хроматина.

а—клетки мозга: 1—интактных куриных эмбрионов, 2—эмбрионов с выключенной щитовидной железой, 3—после действия тироксина на фоне тиомочевины; б—клетки печени: 1—норма, 2—после действия тиомочевины, 3—после введения тироксина на фоне тиомочевины; в—тканеспецифичность: 1—кислых белков хроматина клеток мозга, 2—печени.

ция щитовидной железы была эффективно выключена, выявляется исчезновение двух белковых фракций. Введение тироксина ( $10^{-7}$  М на 1 эмбрион) возвращает спектр кислых белков в нормальное состояние. Аналогичным образом меняются спектры кислых белков хроматина клеток печени при включении и выключении функции щитовидной железы (рис. 4, б).

Сравнение спектров кислых белков хроматина, выделенных из тканей 15-дневных куриных эмбрионов, показывает, что при почти одинаковом количестве белковых фракций (34 и 33 в печени и мозге соответственно) существуют значительные различия в распределении белковых дисков в идентичных условиях (отмечены стрелками на рис. 4, в). Поскольку подвижность белковых фракций при электрофорезе в додецилсульфат-полиакриламидной системе обусловлена зарядом, конфигурацией и главным образом молекулярными весами фракций, можно предположить, что кислые белки этих тканей различаются между собой наличием или



отсутствием определенных молекул. Наряду с этим отмечается различное количество одинаковых фракций кислых белков хроматина печени и мозга.

Спектр кислых белков тканей отражает биохимическую дифференцировку различных клеток. Наличие тироксинзависимых фракций кислых белков указывает на участие тиреоидных гормонов в биохимической дифференцировке исследованных тканей.

Таким образом, наблюдаемые нами факты индукции синтеза определенных фракций цитоплазматических белков, кислых белков хроматина печени и мозга под влиянием тироксина, а также ряд доказательств по индукции синтеза *de novo* различных фер-

Таблица 5

Латентный период 10%-ной стимуляции синтеза ядерной РНК стероидными и тиреоидными гормонами (Tata, 1968).

Гормон	Ткань	РНК меченая		РНК-полимераза низкой ионной силы		РНК-полимераза высокой ионной силы		Хроматин	
		t, час	%	t, час	%	t, час	%	t, час	%
Эстроген Гормон роста	Матка крысы	2-10*	500	1	150	24	50	2	70
	Печень крысы	1	50-100	2	80	Не влияет		—	
	Мышца крысы			18	50	18	50	Подавлен	
Гидрокортизон Тиреоидные гормоны	Печень крысы	1	300	2-4	75	Не влияет		4	30
	Печень крысы	3	300	12	200	24	50	4**	50
	Печень головастиков	8	600	—	—	—	—	—	—

\* Время в минутах; \*\* — в днях.

ментов, таких как  $\alpha$ -глицерофосфатдегидрогеназа митохондрий (Lee et al., 1959; Lagdy et al., 1960), кислая фосфатаза, цитохромоксидаза (Metzenberg, 1961; Kun et al., 1966; Delsol et al., 1966), карбамилфосфатсинтетаза печени головастиков (Cohen, 1970), а также индукция взрослого гемоглобина (Moss, Ingram, 1965) находятся в соответствии с данными по индукции синтеза *de novo* различных белков и ферментов стероидными гормонами.

Латентный период действия тиреоидных гормонов на синтез РНК и белков много больше, чем латентный период действия стероидных гормонов (Tata, 1968) (табл. 5).

Латентный период усиления синтеза белка после введения стероидных и тиреоидных гормонов, согласно J. R. Tata (1968), обусловлен скоростью образования полисомных агрегаций из вновь образованных под действием гормонов рибосом.

Предположение J. R. Tata подтверждается также исследованиями G. Litwack (1971), G. Litwack, S. Singer (1972), установившими, что введение кортизона адреналэктомированным крысам

приводит к образованию полисомных агрегаций, выявляемых при аналитическом ультрацентрифугировании.

На основании этих данных J. R. Tata пришел к выводу, что тиреоидные гормоны, также как стероидные, регулируют синтез белка посредством усиления синтеза рибосомальных РНК, ускорения образования полисом и эндоплазматического ретикулума.

Электронно-микроскопическими исследованиями J. R. Tata (1968) и M. W. Rancourt, G. Litwack (1968) было установлено ускорение образования полисом из моносом после введения тиреоидных и стероидных гормонов.

Наши исследования по влиянию физиологических концентраций тироксина на ультраструктуру клеток печени куриных эмбрионов также свидетельствуют об увеличении полисомных агрегаций после введения гормона.

Анализ наших и литературных данных по участию тиреоидных гормонов в процессе регуляции синтеза белка показывает, что эти гормоны индуцируют *de novo* синтез ряда ферментов и кислых белков хроматина. Усиление синтеза белка после введения гормона является, главным образом, результатом индукции синтеза новых популяций РНК, усиления транскрипции всех классов РНК, усиленного образования полисомных агрегаций и гормоном обусловленного созревания других компонентов белоксинтезирующей системы.

Данные по индукции синтеза ряда ферментов и белков позволяют предположить, что для обеспечения синтеза перечисленных ферментов и белков *de novo* необходима предварительная индукция синтеза ядерной Д-РНК, а также информационной РНК тиреоидными гормонами, т. е. тиреоидные гормоны должны участвовать в процессе избирательного включения и выключения генетической активности клеток.

До настоящего времени в литературе отсутствуют прямые данные, доказывающие индукцию синтеза индивидуальной информационной РНК для того или иного тироксином индуцированного фермента, как это было показано в случае стероидной индукции *de novo* синтеза овальбумина и тирозинаминотрансферазы, но имеющийся фактический материал и литературные данные указывают на участие тиреоидных гормонов в регуляции процесса транскрипции.

### **Влияние тиреоидных гормонов на процессы транскрипции РНК**

Изучение этого вопроса было начато и получило развитие в исследованиях J. R. Tata et al. (Tata, 1964, 1965, 1967, 1967 a, 1968, 1968 a, 1970; Tata, Widnell, 1966; Tata, Williams-Ashman, 1967). Ими было обнаружено увеличение содержания РНК во фракции микросомы, выделенной из печени гипертиреоидных крыс. Во времени этому сдвигу предшествовало увеличение РНК-поли-



меразной активности в ядрах печени. Однако наиболее ранним из отмеченных эффектов трийодтиронина явилось возрастание скорости синтеза и обмена быстрометящейся фракции ядерной РНК (судя по включению  $C^{14}$ -оротовой кислоты). Если расположить зарегистрированные изменения по времени от момента введения животному трийодтиронина, то возникает следующая картина действия гормона: через 4—6 час. удается отметить повышение синтеза быстрометящейся ядерной РНК; затем возрастает активность РНК-полимеразы, но характерно, что раньше меняется активность фермента, образующего рибосомную РНК, а уже позднее (после увеличения синтеза фосфолипидов одновременно с активацией включения аминокислот в белки митохондрий и микросом) повышается активность полимеразы, участвующей в синтезе ДНК-подобной РНК. Повышение РНК-полимеразной активности подтверждается также исследованиями J. R. Tata, V. C. Widnell (1966), которые показали, что ядра, выделенные из клеток печени тироксином обработанных животных, в минимальной среде инкубации обладают большей РНК-полимеразной активностью по сравнению с ядрами, выделенными из нормальных животных.

Исследования нашей лаборатории также свидетельствуют об активировании РНК-полимеразы после введения тироксина *in vivo*, а также при инкубации очищенных ядер в присутствии тироксина и гормон-белкового комплекса *in vitro*. Эти данные отчетливо показывают, что тироксин, введенный *in vivo* в физиологических концентрациях ( $\approx 1 \cdot 10^{-7} M$ ), способен стимулировать РНК-полимеразную активность ядер клеток печени куриных эмбрионов.

Подобная способность тироксина подтверждается также в опытах *in vitro*:

<i>Условия инкубации очищенных ядер</i>	<i>Включение <math>C^{14}</math>-УТФ имп/мин/мг ДНК, % (среднеарифметическое <math>\pm</math> параллельных проб)</i>
Ядра + среда инкубации + 0,1 мл 0,01 н NaOH	100
Ядра + среда инкубации - $5 \cdot 10^{-7} M$ тироксина	119
Ядра + 200000 $\times g$ цитоплазма в среде инкубации	141
Ядра + 200000 $\times g$ цитоплазма в среде инкубации + $5 \cdot 10^{-8} M$ тироксина	221
Ядра + 200000 $\times g$ цитоплазма в среде инкубации + $2,5 \cdot 10^{-6} M$ тироксина	275

Как видно из приведенных данных, физиологическая концентрация тироксина и идентичная цитоплазма (200 000  $\times g$  супернатант) увеличивают РНК-полимеразную активность очищенных

ядер клеток печени 16-дневных куриных эмбрионов. Однако комплекс тироксина с 200 000Xg супернатантом цитоплазмы обладает резко выраженной РНК-полимераза-стимулирующей активностью (221 и 275% при использовании  $5 \cdot 10^{-8}$  и  $2,5 \cdot 10^{-6}$  M тироксина в комплексе соответственно). Значение этого факта будет обсуждено ниже.

Используя ДЭАЭ-сефадекс, E. A. Smicler, J. R. Tata (1971) получили 3 фракции ДНК-зависимой РНК-полимеразы, каждая из которых обладала ферментативной активностью. При введении подопытным животным трийодтиронина или гормона роста было отмечено, что они различно влияют на выход и специфическую активность каждой фракции. Трийодтиронин стимулировал как количество, так и специфическую активность фермента, участвующего в синтезе рибосомной РНК.

Применением метода гибридизации молекул ДНК-РНК, при котором постоянное количество меченой РНК гибридизовалось с возрастающими количествами ДНК (Tata, 1968), доказано, что трийодтиронин в первую очередь повышает синтез рибосомальной РНК в клетках печени головастика.

Используя метод гибридизации РНК-ДНК при насыщающем избытке РНК, мы исследовали влияние тироксина на синтез цитоплазматических РНК печени куриных эмбрионов, получавших физиологическую дозу гормона ( $10^{-7}$  M на 1 эмбрион) (Хамидов и др., 1974, Абдукаримов и др., 1975).

В наших опытах постоянные количества немеченой денатурированной ДНК, выделенной из семенников петуха, инкубировались с различными количествами тотальной цитоплазматической РНК печени контрольных и опытных куриных эмбрионов, меченой *in vitro*  $J^{125}$  по методу S. L. Sommerford (1972). Количество РНК увеличивалось до полного выхода реакции гибридизации на плато насыщения. Эксперимент должен был разрешить два вопроса:

1. Синтезируются ли под действием гормона качественно новые популяции цитоплазматической РНК. Поскольку около 95% цитоплазматической РНК состоит из рибосомальной и транспортной РНК, качество популяций которых постоянно в клетке, предполагалось, что качественно новые популяции должны появляться в информационной РНК, что отразится на величине плато насыщения гибридизации, так как обеспечение огромного избытка РНК в среде отжига создает условия для комплементаризации представителей всех имеющихся популяций с ДНК. Очевидно, что наличие определенного количества новой популяции РНК в этих условиях повышает точку насыщения гибридизации.

2. Одинаковы ли количественные выражения идентичных популяций РНК при действии гормона. Если количественные выражения популяций двух сравниваемых этим методом гибридизации РНК будут одинаковы, то скорости выхода реакции гибридизации на плато насыщения должны быть идентичными. Анализ кинетики реакции гибридизации и плато насыщения общей цитоплазматической



ческой РНК, выделенной из клеток печени нормальных и тироксинизированных куриных эмбрионов, показывает, что введение тироксина не вызывает достоверного изменения в появлении качественно новых популяций РНК (рис. 5).

Хотя наши опыты однозначно ответили на поставленный вопрос, трудно согласиться с фактом отсутствия качественно новых популяций РНК после действия гормона, поскольку эксперименты по индукции тироксинзависимых фракций как кислых белков хроматина, так и растворимых белков цитоплазмы, свидетельствуют об обратном. Вероятно, для выявления всего

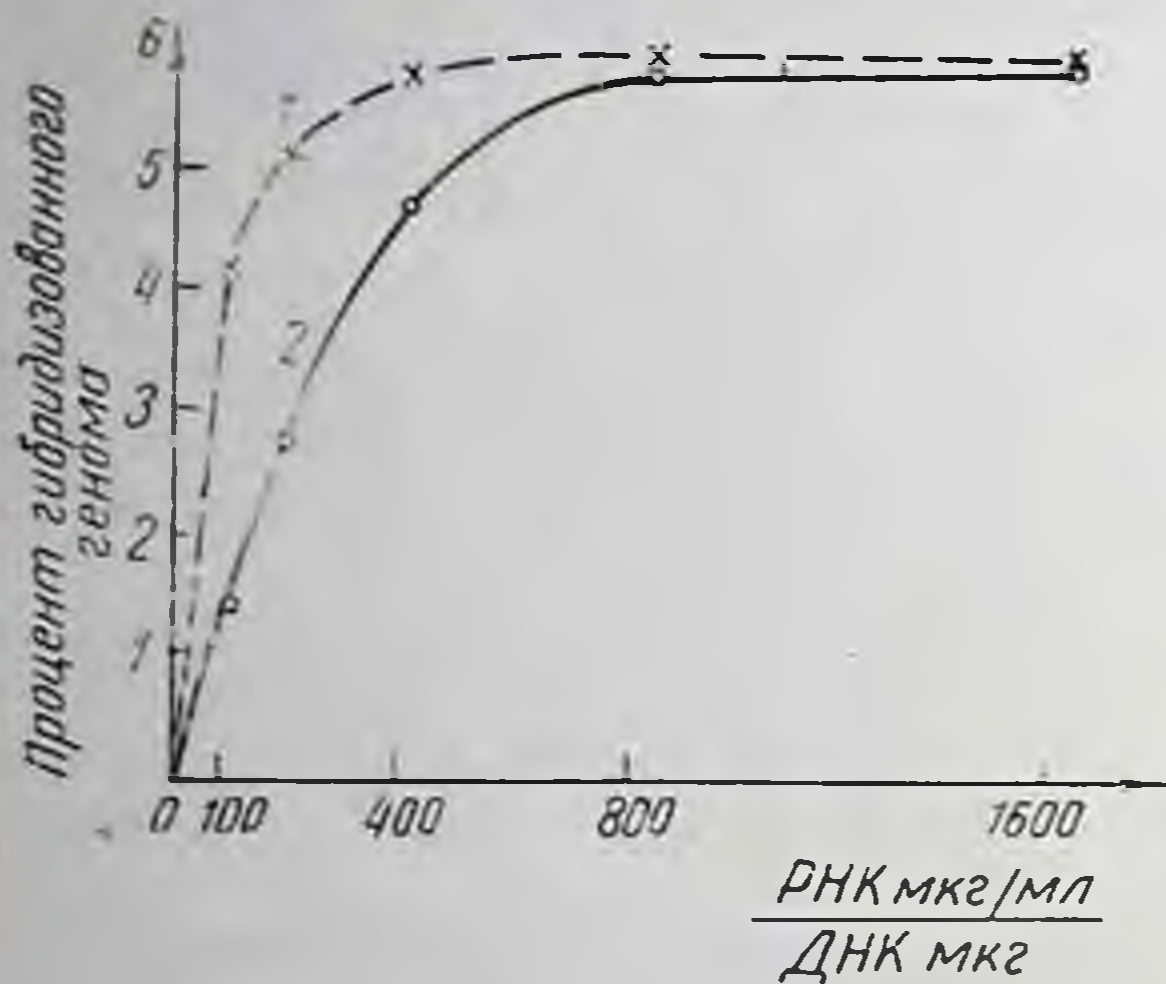


Рис. 5. Кинетика гибридизации:

1 — тироксин индуцированной, 2 — нормальной цитоплазматической РНК.

нескольких качественно новых популяций иРНК, кодирующих синтез 2—3 специфических белков, в условиях, когда в клетке одновременно функционируют тысячи различных популяций иРНК, порог чувствительности примененного нами метода гибридизации высок. По-видимому, применение других высокочувствительных методов выявит триоксиновую индукцию синтеза иРНК, обуславливающую синтез тироксинзависимых фракций кислых белков, белков цитоплазмы и ряда гормониндуцируемых ферментов и белков, о которых было сказано ранее.

Как видно из наших данных, уровни насыщения гибридизации цитоплазматической РНК печени нормальных и тироксинизированных куриных эмбрионов одинаковы, но кинетика гибридизации этих РНК заметно различается, особенно при малых соотношениях РНК/ДНК. Этот факт показывает, что введение гормона куриным эмбрионам приводит к сильному увеличению синтеза определенных популяций РНК, транскрибируемых с повторяющихся последовательностей ДНК, описанных R. J. Britten, D. E. Kohne (1968) по кинетике реассоциации денатурированной ДНК и G. P. Georgiev (1969) по кинетике реакции гибридизации РНК-ДНК.

Согласно Г. П. Георгиеву, одинаковые количества РНК различных популяций тем скорее будут входить в комплементарные отношения с ДНК, чем больше в структуре ДНК комплементарных или повторяющихся участков для данной популяции РНК. Поскольку из трех классов РНК именно рибосомальная имеет наибольшие повторяемые последовательности цистронов в геноме,

можно предположить, что ускорение кинетики гибридизации РНК, выделенной из тироксинизированной печени, обусловлено именно усилением синтеза рибосомальной РНК.

Гибридизационный анализ показал усиление синтеза рибосомальной РНК при содержании головастиков в воде с физиологической концентрацией трийодтиронина (Tata, 1968). В отличие от наших экспериментов, реакция гибридизации проводилась при избытке ДНК.

В опытах с использованием меченой  $C^{14}$ -оротовой кислоты и  $P^{32}$  было показано, что гормон щитовидной железы ускоряет синтез не только рибосомной, но и митохондриальной, а также растворимой РНК (Tata, Widnell, 1966). Координированно с синтезом РНК происходила стимуляция синтеза белков и фосфолипидов, что указывает на одновременное образование РНК и клеточных мембран (Tata, 1967, 1968). Характерно, что гормональный эффект на включение аминокислот проявляется в рибосомах, но максимальное гормональное действие возможно в том случае, когда рибосомы связаны с цитоплазматическими мембранами, формирующимися параллельно с дополнительными рибосомами. Изменяется архитектура клетки, что выражается в увеличении рибосом и полисомных агрегаций, повышении количества шероховатого эндоплазматического ретикулума, что характерно для ситуаций с усиленным синтезом белка.

Изменение внутриклеточной архитектуры гепатоцитов при введении физиологических доз тиреоидных гормонов наблюдалось и в наших экспериментах.

Электронно-микроскопические данные показывают, что введение в куриный эмбрион  $10^{-8}$  М тироксина на 12-й день развития вызывает ряд характерных ультраструктурных изменений, среди которых выделяется четкое увеличение числа рибосом и полисомных агрегаций (Хамидов и др., 1974).

Для выяснения того, какие именно последовательности генома куриного эмбриона активируются при введении физиологических количеств тироксина, была предпринята серия экспериментов по гибридизации тотальной цитоплазматической РНК печени нормальных и тироксинизированных животных с фракциями ДНК, состоящими из последовательностей, повторяющихся в различной степени. С этой целью очищенную ДНК из петушиных семенников с удовлетворительными оптическими свойствами дробили на ультразвуковом излучателе на фрагменты длиной 300—500 нуклеотидов. Обработка препаратов ДНК в режиме УЗДН-1 в течение 3 мин. частотой 22 гц при силе тока 0,3 ма позволяет достичь желаемого результата. Затем препараты ДНК подвергали тепловой денатурации, нагревая их в водяной бане до  $100^{\circ}C$  в течение 10 мин. с последующим охлаждением в ледяной бане. Часть препаратов ДНК сразу же после охлаждения пропускали через колонку, наполненную гидроксипатитом, нагретую до  $62,5^{\circ}C$  и элюировали сначала 0,14 М Na-фосфатным буфером одноцепочеч-



ную ДНК. Гидроксипатит в этих условиях задерживает реассоциированную двуцепочечную ДНК, которая элюируется из колонки 0,5 М Na-фосфатным буфером. Реассоциированную ДНК отмечали как ДНК  $C_0t=0$ .

Одноцепочечную ДНК последовательно отжигали до значений  $C_0t=500$  и 5000. Одноцепочечную ДНК, элюированную 0,14 М Na-фосфатным буфером после отжига до значения  $C_0t=5000$ , рассматривали как уникальные последовательности, а реассоциированную часть ДНК в этих условиях рассматривали как ДНК  $C_0t=5000$ . Полученные препараты двуцепочечной ДНК  $C_0t=0$ ,  $C_0t=500$ ;  $C_0t=5000$  и уникальные последовательности  $C_0t>5000$  сажали на нитроцеллюлозные фильтры типа В-6 фирмы Schleicher, Schull строго количественно в присутствии 1 нМ Mg в  $2\times SSC$  (стандартный солевой раствор). Отжиг проб проводили в течение 36 час. при  $66^\circ\text{C}$  в присутствии 1 нМ ЭДТА. Среднеарифметические значения из 5 параллельных опытов представлены ниже:

Фракция ДНК-повторов	Процент гибридизованного генома	
	с нормальной РНК	с тироксином индуцированной РНК
$C_0t = 0$	1,685	2,87
$C_0t = 500$	1,72	5,16
$C_0t = 5000$	3,72	4,94
$C_0t > 5000$ (уникальные последовательности)	1,31	1,46

Как видно, в наших условиях гибридизации (отношение РНК/ДНК=450) *in vivo* меченая  $\text{P}^{32}$  тотальная цитоплазматическая РНК из печени тироксинизированных 17-дневных эмбрионов более эффективно по сравнению с идентичной РНК из печени нормальных эмбрионов гибридизуется со всеми фракциями повторяющихся последовательностей ДНК ( $C_0t=0$ ,  $C_0t=500$ ,  $C_0t=5000$ ). В то же время гибридизуемость этих РНК с уникальными последовательностями ДНК ( $C_0t>5000$ ) минимальная. Наибольшей гибридизуемостью с нормальной РНК обладают умеренно и редко повторяющиеся последовательности ДНК ( $C_0t$  от 500 до 5000). Введение же тироксина предпочтительно повышает транскрипцию с часто и умеренно повторяющимися последовательностями ДНК ( $C_0t$  от 0 до 500). Поскольку рибосомальные цистроны расположены именно в этих последовательностях, а цистроны для иРНК — в уникальных последовательностях (O'Malley et al., 1973), есть основание заключить, что введение гормона усиливает транскрипцию преимущественно с рибосомальных цистронов, хотя усиление транскрипции с умеренно и редко повторяющихся последовательностей также значительно. Однако гормональную стимуляцию транскрипции с редко повторяющихся последовательностей ДНК ( $C_0t=5000$ ) объяснить гормональной индукцией только иРНК не представляется возможным, поскольку значение  $C_0t=5000$  включает



в себя значения  $C_0t$  от 500 до 5000. В этих пределах могут встречаться повторяющиеся последовательности разной частоты и величины.

Сказанное подтверждается и тем, что настоящие уникальные последовательности ДНК (O'Malley et al., 1973) в условиях наших экспериментов (отношение РНК/ДНК=450) одинаково слабо гибридизуются как с нормальной РНК, так и с РНК, выделенной из цитоплазмы печени тироксинизированных куриных эмбрионов.

Эти данные согласуются с данными J. Koch, A. Stuceau (1971), наблюдавшими увеличение количества работающих цистронов рибосомальной ДНК в геноме после введения физиологических количеств трийодтиронина в культуру клеток печени человека.

Согласно данным Г. П. Георгиева и др. (1968), ядерная высокополимерная гетерогенная РНК состоит из двух типов РНК. Одна содержит много повторяющихся последовательностей и является предшественником рибосомной РНК, экстрагируется фенолом при низких температурах. Второй тип состоит из истинных предшественников иРНК, экстрагируется фенолом при более высоких температурах. В основных наших опытах РНК экстрагировалась горячим фенолом (0—80°C). Очевидно, при такой температуре экстрагируются оба типа ядерной РНК (Арион, Георгиев, 1967).

Для выяснения вопроса о возможной регуляции тиреоидными гормонами синтеза качественно новых популяций ядерной гетерогенной высокополимерной РНК нами были поставлены опыты по конкурентной гибридизации РНК, выделенных из печени куриных эмбрионов и однодневных цыплят различных экспериментальных моделей.

Куриным эмбрионам на 8-й день развития вводили по 4 мг 6-метилтиоурацила в 0,1 мл 0,01 н. NaOH. Контрольным эмбрионам вводили по 0,1 мл 0,01 NaOH. На 14-й день подопытным эмбрионам вводили по 1 мкг L-тироксина в 0,1 мл 0,01 н. NaOH. Забой всех экспериментальных моделей производили на 17-й день развития, затем изолировали печень на холоде и выделяли тотальную ядерную РНК. Тотальная ядерная РНК выделялась также из печени однодневных цыплят.

Для получения высоко меченой ядерной РНК к кашице печеночной ткани однодневных цыплят добавляли два объема вдвое разведенной среды инкубации (Robinson, 1949), мягко гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера со слабо притертым тефлоновым пестиком и добавляли  $\text{Na}_2\text{HP}^{32}\text{O}_4$  без носителя с удельной активностью 10 мкюри/10<sup>-8</sup> г, из расчета 0,5 мкюри на 1 мл инкубационной смеси. Инкубацию проводили в течение 30 мин. при 37°C при перемешивании. Реакцию останавливали введением 6 объемов ледяного 0,14 М NaCl. Меченую тотальную ядерную РНК выделяли по Г. П. Георгиеву. Гибридизацию РНК-ДНК проводили на ДНК-гелях, сшитых ультрафиолетовым облучением (табл. 6).



Согласно данным лаборатории Г. П. Георгиева, выход реакции гибридизации на плато насыщения наблюдается при ДНК/РНК = 80—300. Столь заметные колебания зависят от чистоты препарата ДНК, его молекулярного веса и класса гибридизуемой РНК. Поэтому наши исследования проводились при соотношении ДНК/РНК = 400.

В результате гибридизации меченой ядерной РНК печени однодневных цыплят с ДНК, выделенной из семенников петуха, выявлено, что истинные гибриды составляют 12% от вносимой метки. При использовании в качестве специфического конкурента немеченой идентичной РНК в соотношении немеченая РНК/меченая РНК = 30 гибридизация меченой РНК сильно снижается (3%) и

Таблица 6

Конкурентная гибридизация высокополимерной ядерной РНК (0—80°C) печени эмбрионов, выделенных после введения 6-метилтиоурацила и 6-метилтиоурацила + тироксин, с меченой ядерной РНК (0—80°C) печени однодневных цыплят

Конкурирующая РНК	Имп/100 сек. $M \pm m$	% гибридизации меченой РНК	% конкуренции
Меченая РНК однодневных цыплят без конкурента	$3072 \pm 57$	12	—
Конкурент — немеченая РНК однодневных цыплят	$766 \pm 44$	3	75
Конкурент — немеченая РНК нормальных 17-дневных эмбрионов	$1172 \pm 92$	4,6	61,7
Конкурент — немеченая РНК 17-дневных эмбрионов, которым на 8-й день развития введен 6-метилтиоурацил	$1264 \pm 35$	5	58,4
Конкурент — немеченая РНК 17-дневных эмбрионов, которым на 8-й день развития введен 6-метилтиоурацил и на 14-й день — тироксин	$798 \pm 49$	3,1	74

Примечание. Соотношение ДНК-гель/РНК = 400 (4 мг ДНК гель/100 мкг РНК). Соотношение РНК меч./РНК немеч. = 1/30; удельная активность РНК к моменту подсчета импульсов — 2560000 имп/мг за 100 сек., отжиг 36 час. при 66°C в 2 × SSC.

наблюдается максимальная конкуренция, тогда как немеченая РНК печени 17-дневных эмбрионов менее конкурентоспособна.

Конкурентоспособность ядерной РНК печени 17-дневных эмбрионов, получивших 6-метилтиоурацил до становления эндокринной функции (8-й день развития), с меченой ядерной РНК печени однодневных цыплят наименьшая. Если же в качестве конкурента использовать немеченую ядерную РНК из печени 17-дневных эмбрионов, получивших тироксин на фоне действия 6-метилтиоурацила (14-й день развития), наблюдается резкое снижение процента гибридизации меченой РНК и увеличение конкурентоспособности немеченой РНК. Таким образом, наши экспериментальные данные показывают, что спектры ядерной РНК печени одно-

дневных цыплят отличаются от спектров ядерной РНК других стадий развития.

Введение тироксина на безгормональном фоне вызывает индукцию биосинтеза нуклеиновых кислот, успешно конкурирующих с ядерной РНК однодневных цыплят.

Об индукции синтеза качественно новых популяций гетерогенной ядерной РНК, экстрагированной горячим фенолом (85°C) при действии физиологических доз тироксина ( $10^{-7}$  M) свидетельствуют также результаты наших гибридизационных экспериментов, выполненных в условиях насыщающего избытка РНК. Ядерную РНК метили *in vitro* радиоактивным йодом ( $J^{125}$ ) по методу S. L. Commerford (1972). Гибридизацию проводили по R. A. Flickinger, F. M. Roche (1972).

Опыты по гибридизации молекул ДНК-РНК при насыщающем избытке РНК *in vitro* выявили, что реакция комплементарного взаимодействия РНК-ДНК выходит на плато насыщения при соотношении РНК/ДНК/мл = 550. Это означает, что только при обеспечении избытка РНК в 550 раз по сравнению с ДНК происходит полное комплементарное взаимодействие представителей молекул различных популяций ядерной РНК с транскрибированными их последовательностями ДНК. Зная количество ДНК и удельную активность РНК, можно вычислить долю генома, участвующего в транскрипции РНК.

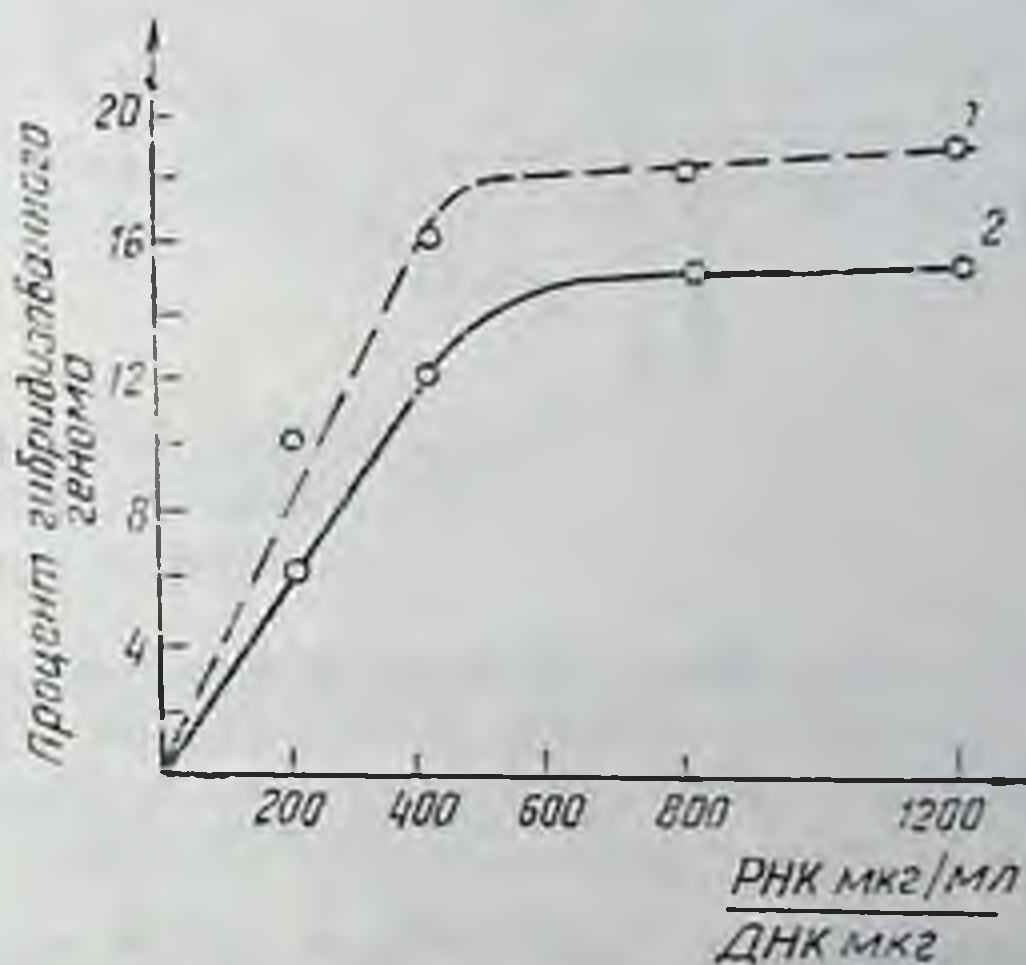


Рис. 6. Кинетика гибридизации

1 — тироксининдуцированной ядерной РНК, 2 — нормальной ядерной РНК.

Оказалось, что меченая ядерная РНК, выделенная из печени 17-дневных эмбрионов, гибридизуется с 14,8% генома, тогда как ядерная РНК из печени эмбрионов, которым вводили тироксин, гибридизуется с 18,6% генома (рис. 6). Следовательно, около 4% генома, участвующего в синтезе ядерной гетерогенной РНК, активируется при действии тироксина.

Кинетика процесса гибридизации тироксином индуцированной ядерной РНК выше по сравнению с нормальной РНК. Это указывает на то, что наряду с индукцией качественно новых популяций РНК при действии тироксина может иметь место и количественное усиление синтеза определенных популяций РНК. Это предположение в известной мере согласуется с данными J. R. Tata et al., (1967, 1968), Д. Х. Хамидова и др. (1974), показавшими



предпочтительное усиление синтеза рРНК в цитоплазме клеток печени головастиков и куриных эмбрионов.

Данные по индукции дополнительной доли генома, участвующего в синтезе гетерогенной ядерной РНК при действии тироксина, подтверждаются также экспериментами по действию тироксина на функциональное состояние хроматина ядер печени куриных эмбрионов (Хамидов и др., 1974; Абдукаримов и др., 1975) (рис. 7).

Изменение функционального состояния хроматина определялось по изменению ультрафиолетовой флуоресценции ядер с использованием флуорохрома акридинового оранжевого, который

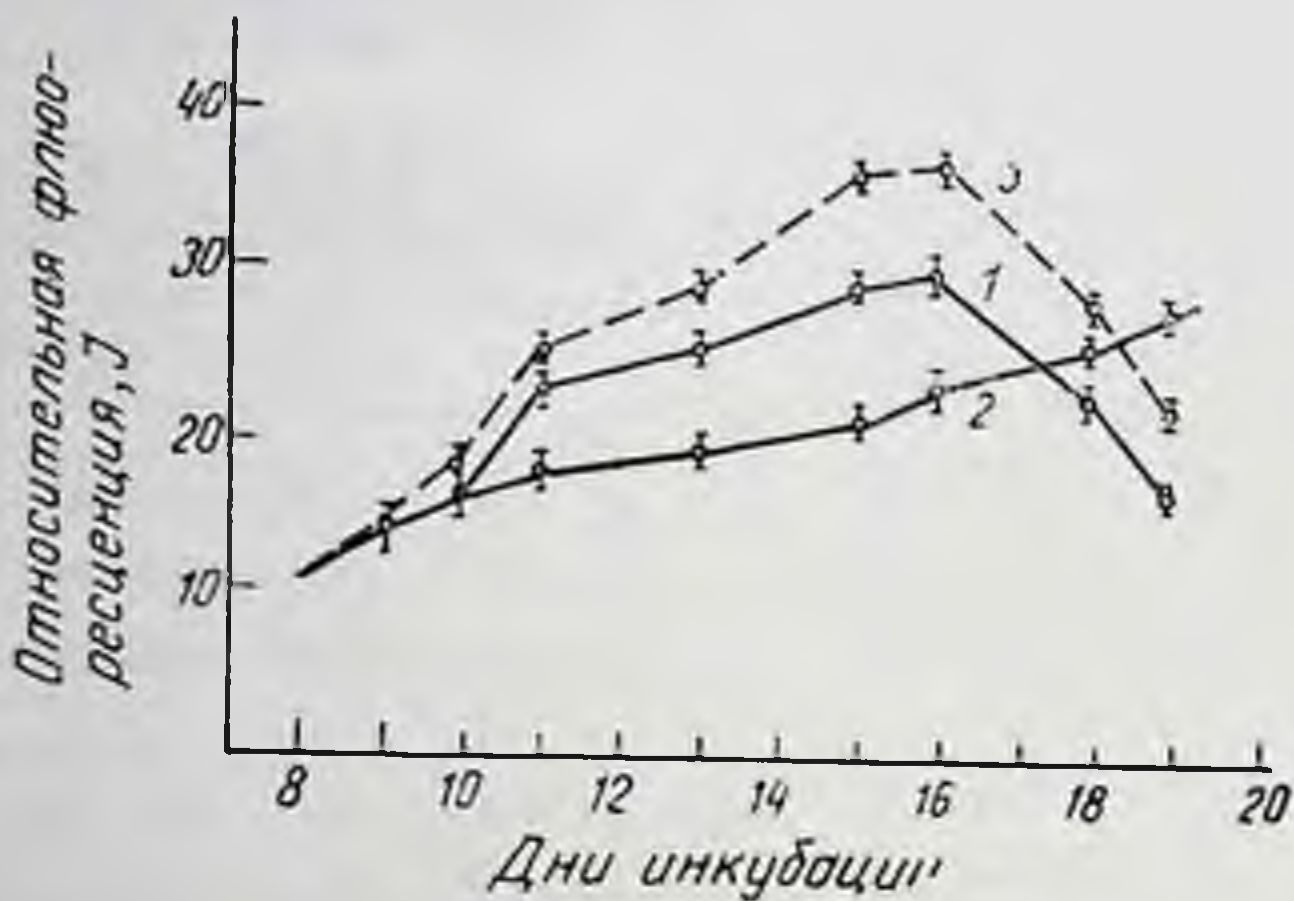


Рис. 7. Изменение функциональной активности хроматина клеток печени куриных эмбрионов.

1—в норме, 2—при выключении функции щитовидной железы 6-метилтиоурацилом, 3—при действии тироксина.

связывается с фосфатными группами ДНК (Stone, Bradley, 1962; Bradley, Wolf, 1959; Борисова, Минят, 1969), а открытые участки ДНК в хроматине рассматриваются как функционально активные.

Наши данные показывают, что на 16-й день развития наблюдается максимум активности хроматина ядер клетки печени нормальных эмбрионов. Выключение функции щитовидной железы введением 6-метилтиоурацила приводит к подавлению активности хроматина, а введение физиологических концентраций тироксина на фоне выключения функции щитовидной железы повышает ее. Эта реакция хроматина на введение тироксина является, по-видимому, функцией снятия блокирующих белков с поверхности ДНК. Подобное увеличение связывания акридинового оранжевого хроматином было отмечено при стимуляции хроматина реактивацией эритроцитов кур в опытах по гибридизации этой функционально не активной клетки с другой соматической клеткой с большой активностью хроматина (Zetterberg, Auer, 1969), а также при снятии контактного ингибирования эпителиальных клеток (Zetterberg, Auer, 1970).



Рассмотренный литературный материал и собственные данные по индукции синтеза *de novo* ряда ферментов и других белков, а также индукция синтеза новых популяций ядерной гетерогенной РНК, усиление синтеза рибосомальной РНК, повышение РНК-полимеразной активности ядер, выделенных из клеток гормоном обработанных животных, и усиление функциональной активности хроматина при введении физиологических доз тироксина указывают на несомненную роль тиреоидных гормонов в регуляции генетической активности гормончувствительных клеток.

Вопрос о том, каким образом реализуется генетический эффект тироксина в регуляции процессов транскрипции, остается пока открытым, однако в настоящее время интенсивно разрабатывается. Тиреоидные гормоны, также как и стероидные, относятся к разряду веществ, легко проникающих в клетку из-за удобной структуры и реализуют свое действие непосредственно на эффекторе.

Некоторая аналогия в механизме генотропного действия этих гормонов и более детальная разработанность вопроса молекулярного механизма регуляции транскрипции стероидными гормонами обязывает нас предварительно рассмотреть этот вопрос на примере стероидных гормонов.

#### • НЕКОТОРЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ ГОРМОНАЛЬНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ПРОЦЕССОВ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНОМА НАСЕКОМЫХ

На основе анализа литературных данных по индукции специфического пuffed-образования политеменных хромосом экдизоном — гормоном метаморфоза насекомых — Р. Karlson (1963) выдвинул гипотезу о гормональной регуляции генетической активности, очень сходную с гипотезой F. Jacob, J. Monod.

По Р. Karlson, пuffed-представления представляют собой места интенсивного синтеза мРНК на матрице ДНК в тех локусах, где экдизон связан с респрессором в качестве аллостерического ингибитора и где, следовательно, происходит дерепрессия генома (рис. 8).

Гипотеза Р. Karlson была первой, объясняющей процесс гормонального активирования функционирования генов с молекулярно-генетических позиций. Несмотря на простоту построения, она включала почти все рациональные моменты представлений о геномной регуляции прокариотов и эукариотов, известных в то время. Хотя впоследствии выяснилась несостоятельность некоторых моментов этой гипотезы, все же она сыграла важную роль в понимании молекулярных механизмов генотропного действия ряда гормонов.

Последующие эксперименты выявили, что введение актиномина Д, ингибирующего синтез РНК, замедляло образование тех пuffed-представлений, которые стимулируются экдизоном в хромосомах слюнных желез личинок во время метаморфоза. Если же экдизон вводился



через 24 час. после действия актиномицина, образовывались только единичные пуффы (I-18-C и IV-2-B), появление которых обусловлено действием экдизона. В то же время пуромидин (ингибитор синтеза белка на уровне рибосом) не влияет на индукцию пуффов экдизоном (Clever, 1965).

В пуффах синтезируется РНК, по нуклеотидному составу соответствующая информационной РНК (Pelling, 1964). Наряду с синтезом РНК под действием экдизона происходит амплификация генов области пуффа (Stocker, Pavan, 1974), а также накопление кислых белков хроматина (Wyatt, 1972). Меченый экдизон, введенный *in vivo*, избирательно связывается с фракцией белков 2S и 3,6S цитоплазмы и ядра, локализуется в цитоплазме, ядре и на

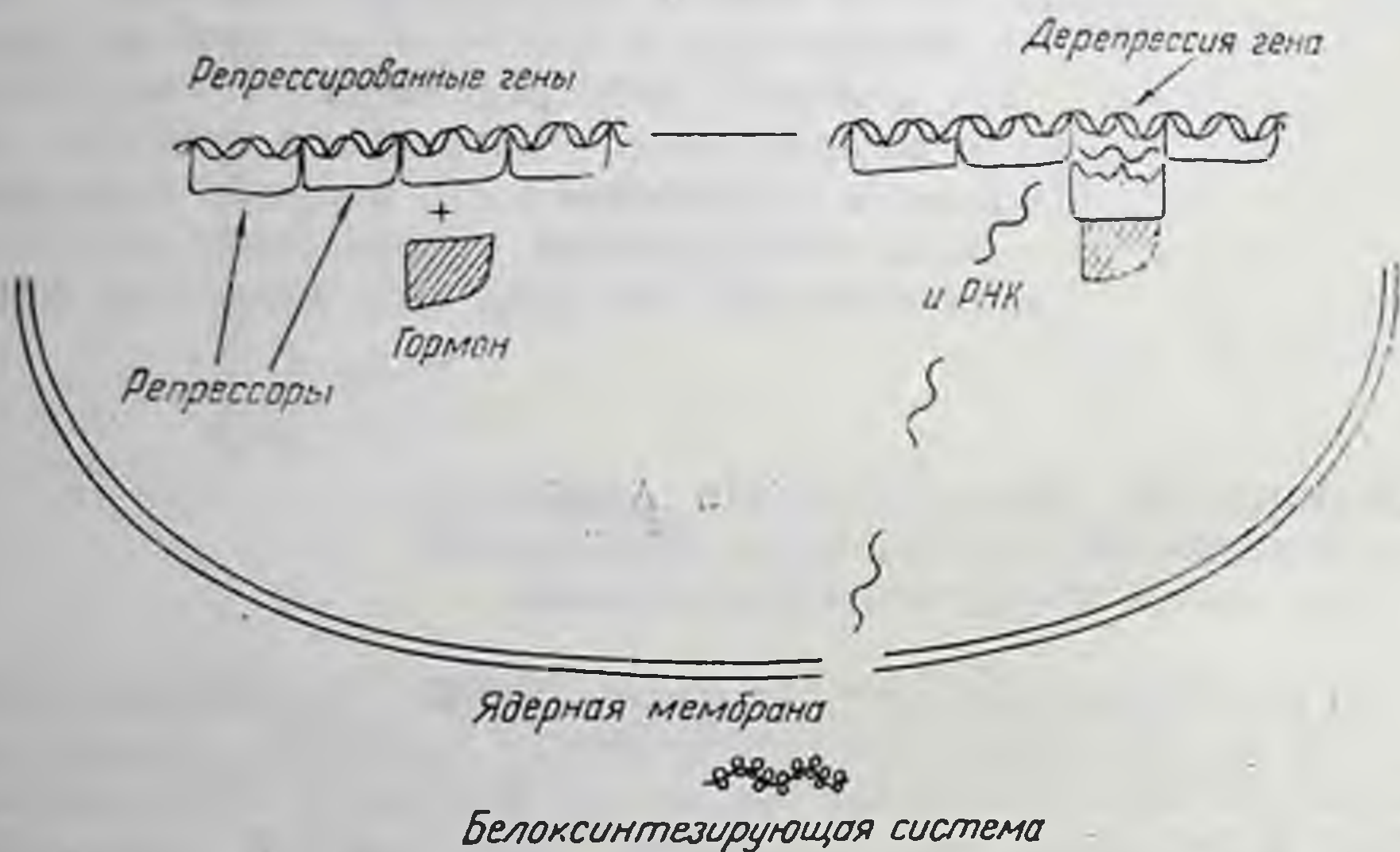


Рис. 8. Гормональная регуляция генетической активности (по Karlson, 1963).

поверхности политенных хромосом (Weirich, Karlson, 1960; Emmegich, 1969, 1970).

Располагая обширными литературными данными, можно выгодно видоизменить и дополнить гипотезу Р. Karlson, оставляя без изменения ее основную идею: гормоны насекомых дерепрессируют участок генома в области пуффообразования.

В настоящее время существует большое количество исследований, указывающих на общность молекулярных механизмов регуляции генетической активности гормонами линьки насекомых, стероидными и тиреоидными гормонами.

После детального изложения соответствующих исследований по стероидным и тиреоидным гормонам мы попытаемся объединить эти экспериментальные данные и суждения о них.



## СУБКЛЕТОЧНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ И СПЕЦИФИЧЕСКОЕ СВЯЗЫВАНИЕ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ С ВНУТРИКЛЕТОЧНЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ

### Глюкокортикоиды

G. Litwack et al. (1963) после интраперитонеальной инъекции меченого кортизола обнаружили быструю внутриклеточную аккумуляцию его в ткани печени. Через 45 мин. 30—45% введенной метки аккумуляровалось в цитоплазме, 6—13% связывалось с цитоплазматическими макромолекулами. После фракционирования в колонке с ДЭАЭ сефадексом А-50 удалось обнаружить 4 гормонсвязывающих фракции. Более полярные метаболиты кортизола были связаны с фракцией I даже после очистки. Другие полярные метаболиты хорошо связывались с фракцией II также после очистки. Нативный кортизол и его анионные метаболиты связывались с фракциями II и IV, однако фракция IV имела низкое сродство к кортизолу по сравнению с тестостероном и прогестероном (Samuels, Tomkins, 1970).

Изобилие рецепторов для всех стероидов в цитоплазме печени объясняется тем, что именно здесь происходит распад и инактивация стероидных гормонов. Неизмененный кортизол связывается специфически с фракцией II.

Детальные исследования связывающих свойств остальных трех фракций цитоплазмы для разнообразных стероидов и их метаболитов обсуждаются в обзоре G. Litwack, S. Singer (1972).

J. D. Baxter and G. M. Tomkins (1970), изучая взаимоотношения между связыванием глюкокортикоида и индукцией тирозинаминотрансферазы в культурах клеток гепатомы, выявили специфический рецептор как в цитоплазме, так и в ядерной фракции. M. Beato et al. (1970, 1970a) из цитоплазмы клеток печени методом ультрацентрифугирования в плотности сахарозы выделили гликопротеин с коэффициентом седиментации 4S (молекулярный вес 80 000), с изоэлектрической точкой = 4. Эта фракция во многом отличается от описанной G. Litwack II связывающей фракции. Например, при физиологической температуре (37°C) связывание крепче, чем при низкой. Напротив, согласно R. Filler et al. (1972), II связывающая фракция Litwack является истинным рецептором кортизола, поскольку она сравнительно быстро насыщается при концентрации гормона в цитоплазме 0,1 пМ и в физиологических условиях мягко связывает глюкокортикоид. Эта фракция обнаружена также в цитоплазме лимфосаркомы Р-1798 мышей (Holland, Chin, 1966), в клетках культивируемых фибробластов мышей (Hackney et al., 1970). Однако M. Beato (1970b) считает, что 4S-гликопротеид, обнаруженный им в цитоплазме, может участвовать в транспорте кортизола из цитоплазмы в ядро.

Как уже отмечалось, глюкокортикоиды вызывают агрегацию.



рибосом в полисомы (Litwack, Singer, 1972), хотя не связываются с рибосомами и предпочтительно связываются с гладким эндоплазматическим ретикулумом, а не с шероховатым (Mayewski, Litwack, 1969). Связывание радиоактивного кортизола и кортикостерона было изучено в *in vitro* опытах с интактными и озвученными митохондриями методом равновесного фракционирования (Loeb, Kimberg, 1970). Происходит незначительное связывание этих гормонов с митохондриальной мембраной, а в растворимых белках обнаруживаются следы гормона, количество которого много ниже физиологической концентрации его в целой клетке. Авторы пришли к выводу, что указанные гормоны не участвуют в регуляции синтеза митохондриальных белков.

Введенный *in vivo* меченый кортизол обнаруживается в ядерной фракции (Litwack et al., 1963). В опытах Т. М. Морозовой и Р. И. Салганик (1969) наблюдалось накопление меченого  $H^3$ -кортизола на изолированном хроматине ядер печени через 2 час. С увеличением дозы гормона от 250 до 500 *мккюри* содержание его в хроматине возрастало соответственно с 80 до 125—146 *мкМ* на 1 *мг* ДНК. Гормон полностью обнаруживался в осадке хроматина и не определялся в надосадочной жидкости при осаждении хроматина 0,14 *М* NaCl.

Поскольку ядерные гистоны являются возможными регуляторами (респрессорами) транскрипции генома (Allfrey, Mirsky, 1962; Huang, Bonner, 1962; Karlson, 1963), гормоны регулируют синтез иРНК (Karlson, 1963). Гистоны в дальнейших исследованиях были оценены как наиболее удобные кандидаты для взаимодействия с глюкокортикоидами. Предполагалось, что образование специфического гормон-гистонового комплекса приводит к отделению гистона от поверхности репрессированного гена и обуславливает транскрипцию специфической информации.

Подобное представление интенсифицировало исследования по взаимодействию стероидных (глюкокортикоидных) гормонов с внутриядерными компонентами, особенно гистонами и хроматином.

Так, М. Sluysen (1966а, 1969) обнаружил, что меченый кортизол связывается гистонами после введения *in vivo* или после инкубации ядер *in vitro*.

В опытах М. Е. Dahmus, J. Bonner (1965) наблюдалось увеличение матричной активности хроматина печени в том случае, если он был выделен из адреналэктомированных крыс, которым за 4 час. до опыта вводили кортизол. Увеличение матричной активности хроматина происходит и при добавлении к среде инкубации кортизола *in vitro* (Stackhouse et al., 1968).

Н. С. Eaep (1974) также показал, что кортизол и дексаметазон главным образом повышают матричную активность хроматина, депрессируя его гены.

В исследованиях ряда ученых установлено как *in vivo*, так и *in vitro* в различных экспериментальных системах, что кортизол



предпочтительно связывается с аргининбогатыми гистонами (Sluysen, 1966, 1966a, 1969; Sunaga, Koide, 1967, 1967a, Ohtsuka, Koide, 1969). Если принимать средний молекулярный вес гистонов за 12 000, то одна молекула гистона связывает 1—3 М кортизола (Sluysen, 1966a, b). Однако отношение 1 : 1 может быть достигнуто, если систему диализовать против 2 мМ NaCl в течение нескольких часов (Sluysen, 1966a). Было установлено, что альдегид кортизола (21-дегидрокортизол) обладает большей способностью стимулировать РНК-полимеразную реакцию в фрагментах ядер и связывается аргининбогатым гистонам (Sunaga, Koide, 1968). На основе этих данных Takahashi (1968) предложил модель специфического связывания 21-дегидрокортизола с аргининбогатыми гистонами, где избирательно взаимодействуют глиоксальные участки цепи с гуанидиновым остатком.

В отличие от выводов К. Takahashi (1968), в некоторых работах подчеркивается важная роль водородных связей в присоединении различных стероидных гормонов к F<sub>3</sub>-фракции гистонов (Sunaga, Koide, 1967). Однако данные М. Sluysen (1968), а также Н. А. Лавриненко (1969) указывают, что основную роль в связывании стероида белком играют не водородные связи, а гидрофобное взаимодействие гормонов с неполярными участками молекулы гистона. Существуют другие данные, согласно которым кортикостероиды могут связываться непосредственно как с ДНК (T'so, Lu, 1964), так и с кислыми белками хроматина (Морозова, Салганик, 1969). Последним удалось выявить связывание H<sup>3</sup>-кортизола с экстрагированными фракциями этих белков после введения гормона *in vivo*. Обработка хроматина трипсином, избирательно расщепляющим гистоновые белки, не влияет на связывание гормона, тогда как после обработки проназой, расщепляющей и кислые белки, после осаждения хроматина гормоны остаются в супернатанте, т. е. высвобождаются. Эти данные однозначно говорят о рецепторной функции кислых белков хроматина для глюкокортикоидов.

М. Beato et al. (1972), М. Beato, М. Feigelson (1972) применив соответствующие методы, выявили по крайней мере три цитоплазматические белковые фракции, обладающие специфической кортизолсвязывающей способностью. Одна из этих фракций была транскортином (специфическим белком плазмы, связывающим кортизол). Считали, что эта фракция не может играть важной роли в регуляции генетической активности глюкокортикоидами, поскольку после соответствующей очистки она теряла способность связывать синтетические аналоги кортизола — дексаметазон и триаминолон (Beato et al., 1972).

Известно, что транскортин-кортизоловый комплекс из плазмы может участвовать в регуляции геномной активности (Keller et al., 1969; Koch et al., 1970). Недавно группа исследователей (Wegthamer et al., 1973) показала, что в цитоплазме лимфоцитов людей содержится белок, по многим характеристикам приближающийся



к транскортину, хотя с меньшей связывающей способностью. Установлена также возможность локализации транскортина в клетках при применении меченых очищенных антител.

В конце 1974 г. L. Amagal et al., (1974) указанным методом выявили, что транскортиноподобный белок имеется в ядрах гепатоцитов человека. Выделенный из ядер этих клеток транскортин с коэффициентом седиментации 3,7S обладает высокой кортизол-связывающей способностью и при добавлении в комплексе с гормоном к хроматину связывается с ним и повышает его матричную активность. В отличие от транскортина плазмы, ядерный транскортин после диализа теряет способность связывать гормон, но связывается с недиализированным хроматином. При инкубации диализованного хроматина с диализованным ядерным транскортином матричная активность резко падает. После инкубации коэффициент седиментации рецептора повышается с 3,75 до 4,1S.

На основании изложенных данных был сделан вывод, что некий диализуемый материал, имеющийся в ядре, определяет как связывание кортизола с транскортином, так и акцептирование комплекса транскортин — кортизол с хроматином. Этот фактор для транскортина и для хроматина идентичен, поскольку диализ транскортина против хроматина не меняет характеристику связывания гормона. Однако, какие структуры хроматина (кислые белки, гистоны, ДНК) определяют акцептирование транскортин-кортизолового комплекса ядер, пока не известно.

Исследования S. Higgins et al. (1973) свидетельствуют, что цитоплазматический 4S-рецептор глюкокортикоида (дексаметазона) из НТС клеток человека (линия культивируемых клеток гепатомы) успешно может акцептироваться хроматином, выделенным из НТС клеток, и хроматином клеток матки. Обработка этих препаратов хроматина ДНК-азой приводит к полной потере акцептирования, что свидетельствует о наличии акцептирования активированного цитоплазматического гормонрецепторного комплекса с последовательностями ДНК.

### Эстрогены и прогестины

Наличие в эстрогенчувствительных тканях гормонсвязывающих компонентов было установлено E. W. Jensen и H. J. Jacobson в 1962 г. В их опытах  $H^3$ -эстрадиол, введенный неполовозрелым крысам в физиологических количествах, преимущественно распределялся в матке. В последующем было установлено, что хотя печень сильно метаболизирует введенный гормон, в матке неполовозрелых крыс (Jensen, Jacobson, 1962) и мышей (Stone, 1964) эстрадиол накапливается против градиента в неизменном виде.

Радиоавтографические исследования выявили, что эстрадиол связывается как с ядерными, так и с цитоплазматическими компонентами клеток мишеней (King, et al., 1965; Stumpf, Roth, 1966),

причем всегда количество гормональной метки при длительном инкубировании больше в ядрах, чем в цитоплазме, а при опухолях накопление гормона в ядрах еще более усиливается и достигает 90% общего клеточного содержания.

Исследования G. P. Talvar et al. (1964) выявили, что эстрадиол, введенный неполовозрелым крысам, связывается с определенной фракцией белков цитоплазмы клеток матки. T. Toft, G. Gorsky (1966), седиментируя фракцию белков цитоплазмы матки неполовозрелых крыс в присутствии меченого кортизола в сахарозном градиенте, обнаружили, что гормон осаждается с 9,5S-фракцией белков. Маркером коэффициента седиментации служили  $\gamma$ -глобулин и бычий альбумин. Однако позднее было доказано, что коэффициент седиментации эстрадиолового рецептора равняется 8S (Erdos, 1968; Rochefort, Baulieu, 1969). В присутствии 0,2 M NaCl или KCl 8S-рецептор обратимо превращается в 4S-частицу (Erdos, 1968; Jensen et al., 1969 a). E. V. Jensen предполагает, что при больших концентрациях солей 8S-рецептор либо дает 2 субъединицы по 4S, либо претерпевает сильное конформационное изменение.

Многочисленные исследования выявили, что большая часть  $H^3$ -эстрадиола, обнаруживаемого в ядрах тканей мишеней, связана с хроматином (King et al., 1966; Mauger, Chalkey, 1967; Teng, Hamilton, 1968). Из хроматина связанный гормон можно отделять 0,4 M KCl при pH 8,5 (Pusa, Bresciani, 1968). Эстрадиол-рецепторный комплекс, выделенный из ядра, седиментируется при 5S в отличие от цитоплазматического рецептора, который в этих условиях седиментируется при 4S. Оказалось, что коэффициент седиментации ядерного рецептора не зависит от содержания высоких концентраций солей NaCl и KCl в сахарном градиенте (Steggles, King, 1970). В дальнейшем было отмечено агрегирование 5S-ядерного рецептора в отсутствие солей в 8—9S-частицы (Jensen, De Sombre, 1972). Причины этого явления не вполне ясны до сих пор.

Матка взрослых крыс от матки неполовозрелых отличается тем, что часть рецепторов взрослых осаждается в 4S-форме в отсутствие солей (Steggles, King, 1969, 1970). Этот феномен наблюдается также в цитоплазме матки взрослых людей и обезьян (Wyss et al., 1968), в эндометрии овец (Zimmering et al., 1970), а также в ряде опухолей (Jensen, 1971).

После овариоэктомии или гипофизэктомии цитоплазматический рецептор эстрадиола седиментируется в отсутствие солей в зоне 8S, т. е. так же, как рецептор из неполовозрелых крыс (Steggles, King, 1970). Это свидетельствует о влиянии соответствующих гормонов на свойства цитоплазматических рецепторов.

Если ткань матки инкубировать с радиоактивным эстрадиолом при 2°C, гормон связывается в основном 8S-рецептором цитоплазмы. Последующая инкубация в среде при 37°C приводит к перераспределению в сторону ядра гормональной метки, обнаруживаемой автордиографией, и 5S-комплекса, экстрагируемого из ядер (Gorski et al., 1968; Shyamala, Gorski, 1969; Rochefort, Baulieu,



1969; Jensen, De Sombre, 1972). Эти данные указывают на то, что радиоактивный эстрадиол, связанный с внеядерным рецептором при низкой температуре, может трансформироваться в ядерный рецептор под действием повышения температуры.

В отличие от эстрогенов прогестины преимущественно локализируются в цитоплазме (Wiest, Rao, 1971; O'Malley et al., 1970, 1971) в матке морских свинок, кроликов и в яйцеводе цыплят. В опытах В. W. O'Malley et al. (1971) по инкубации срезов яйцевода в среде с радиоактивным прогестероном при 0°C *in vitro* метка в основном локализовалась в цитоплазме. Если срезы матки, содержащие внеядерный прогестин, инкубировать при 37°C в течение 30 мин., 75% клеточной гормональной радиоактивности переходит в ядро.

Применение метода ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы выявило связывание радиоактивного гормона с макромолекулами как в цитоплазме, так и в ядерном экстракте. Как и рецептор эстрогена, рецептор прогестерона в виде комплекса экстрагируется из ядер 0,3 или 0,4 М КСl. После введения меченого гормона *in vivo* цыплятам или инкубации срезов яйцевода с меченым гормоном при 37°C *in vitro*, гормонбелковые рецепторы, выделенные из цитоплазмы и ядерного экстракта в сахарозном градиенте в присутствии КСl соответствующей концентрации, седиментируют в зоне 4S (O'Malley et al., 1970, 1971).

Цитоплазматический гормон-рецепторный комплекс можно получить, инкубируя меченый прогестерон в цитоплазме яйцевода цыплят. В присутствии соли соответствующей концентрации в сахарозном градиенте этот комплекс седиментирует при 3,8S. Если исключить КСl из сахарозного градиента, рецептор-гормональный комплекс осаждается в зоне 5S и 8S (Sherman, 1970; O'Malley, 1970, 1971). У оварэктомированных кроликов прогестерон-рецепторный комплекс цитоплазмы седиментирует в зоне 4S при низкой концентрации солей как после введения H<sup>3</sup>-прогестерона *in vivo*, так и после инкубации с цитоплазмой *in vitro* (Wiest, Rao, 1971; McGuire, De Della, 1971).

Продолжительное введение оварэктомированным кроликам эстрогена приводит к тому, что цитоплазматические рецепторы матки кроликов при отсутствии солей КСl и NaCl седиментируют в зоне 4S и 8S, а при добавлении солей — только в зоне 4S (Wiest, Rao, 1971). Такая же картина седиментирования цитоплазматических гормон-рецепторных комплексов из оварэктомированных и нормальных животных в отсутствие и присутствии солей наблюдается и у морских свинок (Milgrom et al., 1970).

Таким образом, предварительная инъекция эстрадиола морским свинкам и кроликам приводит к появлению 4S-связывающей единицы в цитоплазме клеток-мишеней. Она является рецептором прогестерона и может превращаться частично в 8S-единицу при низкой концентрации КСl. Однако добавление эстрадиола в цитоплаз-



му не вызывает изменений в характере седиментации рецепторов прогестерона (Wiest, Rao, 1971).

В отличие от цитоплазматических прогестерон-рецепторных комплексов матки кроликов, морских свинок и яйцевода цыплят 4S-рецептор прогестерона из цитоплазмы матки крыс может связывать кортизол в одинаковой степени. Этот рецептор по своим физико-химическим и иммунологическим свойствам соответствует транскортину, поскольку имеет такие же антигенные свойства (Milgrom, Baulieu, 1970). Сопоставление литературных данных по рецепторам глюкокортикоидов, эстрогенов, прогестинов свидетельствует о наличии общих черт для всех этих рецепторов, высокой индивидуальной специфичности, а в некоторых случаях универсальности по антигенным участкам (Amagal et al., 1974).

Наличие 4S- и 8S-рецепторов эстрадиола в цитоплазме до введения гормона не подлежит сомнению (Jensen, De Sombre, 1972), но пока нет доказательств существования 5S-рецептора в ядрах клеток матки до введения в организм эстрадиола. Этот комплекс не обнаруживается также при экстракции ядер или их гомогенатов после инкубирования с меченым гормоном *in vitro*, но он легко появляется в ядрах, если предварительно инкубировать срезы матки радиоактивным гормоном (Jensen et al., 1968, 1969; Musliner et al., 1970).

Инкубация ядер в цитоплазме, как было отмечено выше, при 2°C приводит к образованию незначительных количеств 4S-комплекса в ядре, который затем можно экстрагировать 0,3—0,4 М КСl. Если инкубацию проводить при 25—37°C, в ядрах образуется большое количество 5S-рецепторного комплекса. Инкубация ядер с предварительно нагретой до 45°C цитоплазмой, содержащей меченый эстрадиол, подавляет образование 5S-рецепторного комплекса в ядре, так как при высокой температуре разрушается гормон-рецепторный комплекс в цитоплазме.

P. U. Brecher et al. (1970), а также E. V. Jensen et al. (1971) обнаружили образование 5S-ядерного комплекса при медленном нагревании цитоплазмы в присутствии эстрадиола. Очевидно, 4S-комплекс цитоплазмы в этих условиях превращается в 5S-форму. Образование 5S-комплекса повышается при высоких значениях pH: от 6,8 до 8,5. Процесс протекает в присутствии специфического гормона — эстрадиола, поскольку эстроин не влияет на образование 5S-формы рецептора. Эти данные показывают, что в цитоплазме также может находиться фактор трансформации рецепторного комплекса из 4S-формы в 5S-форму. Основываясь на многочисленных литературных данных, а также собственных исследованиях; E. V. Jensen и E. R. De Sombre (1972) предложили схему двустадийных превращений внутриклеточных рецепторов эстрадиола (рис. 9).

Данные, полученные при исследовании прогестинов яйцевода неполовозрелых цыплят, полностью соответствуют предложенной



схеме двустадийных превращений эстроген-рецепторных комплексов в матке различных животных (O'Malley et al., 1970, 1971).

Пока нет четкого ответа на вопрос, каким образом стероидный гормон-рецепторный комплекс движется в ядро и как покидает ядро после осуществления биологической функции. Согласно P. W. Jungblat et al. (1970), цитоплазматические рецепторы стероидных гормонов являются фиксированной частью мембраны или эндоплазматического ретикулула, от которых отрываются в процессе гомогенизации или другого вмешательства. В движении

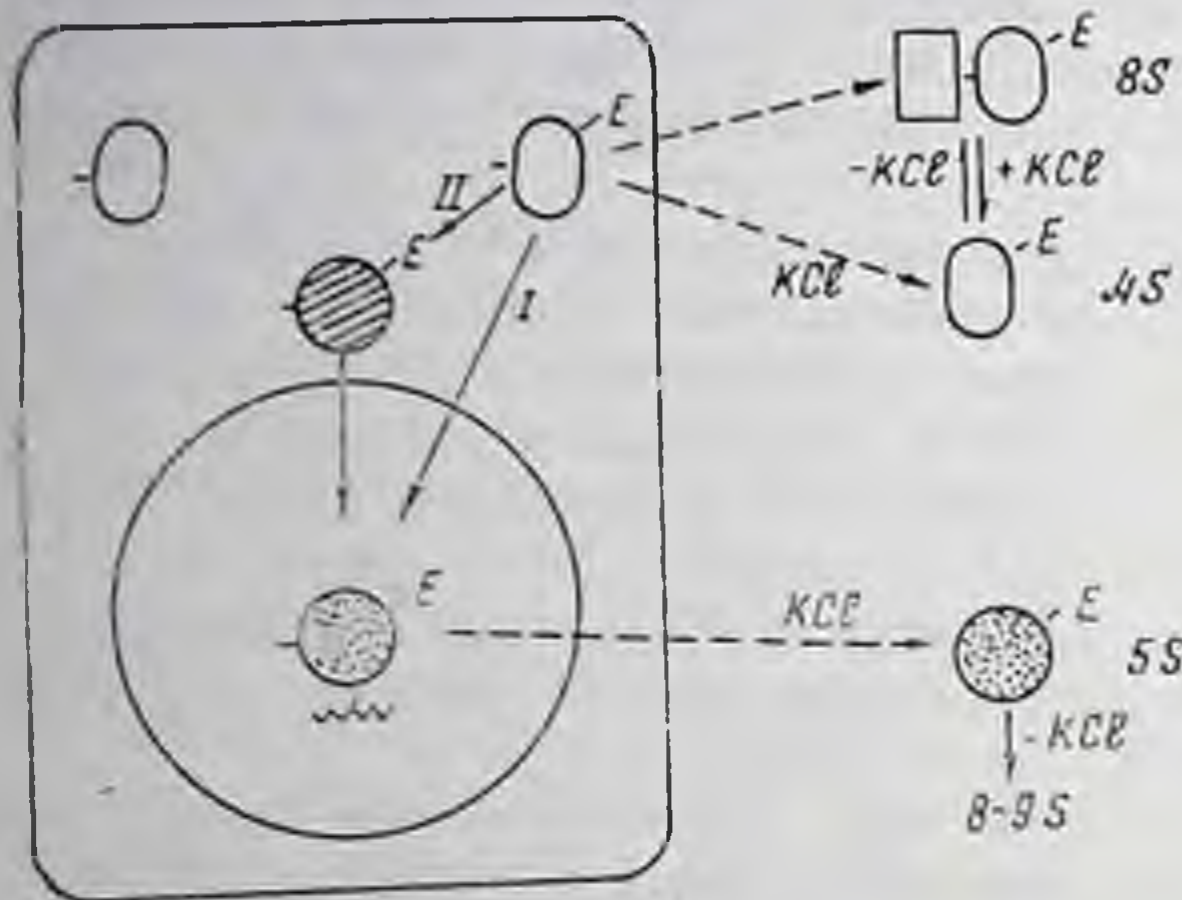


Рис. 9. Схема двустадийных превращений внутриклеточных рецепторов эстрадиола (E) (по Jensen, De Sombre, 1972).

в сторону ядра гормон-рецепторного комплекса участвуют именно эти элементы клеточной структуры. R. E. Smith, C. M. Szego (1971) получили экспериментальное доказательство того, что лизосомы клеток матки начинают мигрировать в ядро после введения *in vivo* эстрогена животным. Авторы предполагают, что лизосомы могут выполнять функцию переносчика внеядерного эстрадиол-рецепторного комплекса.

Согласно данным E. V. Jensen et al. (1971), обмен эстрадиола в ядрах значительно выше и быстрее по сравнению с показателями связывания гормона ядрами. На это указывает тот факт, что после инъекции физиологических доз эстрадиола неполовозрелым крысам содержание цитоплазматического рецептора в 4—5 раз меньше по сравнению с эстрадиолом, находящимся в ядре.

Механизм освобождения от отработанных гормонов и их рецепторов (возможно, от гормон-рецепторного комплекса) после выполнения биологической функции, к сожалению, мало изучен. Частично на этот вопрос отвечают исследования кинетики диссоциации гормонов от специфических рецепторов. В результате изучения скорости диссоциации эстрадиола от его цитоплазматического рецептора выявлено, что скорость диссоциации зависит от температуры и носит двухфазный характер (Best-Belhomme et al., 1970; Tгуong, Baulieu, 1971). При 0°C диссоциация происходит очень медленно, период полужизни гормон-рецепторного комплекса (50% диссоциации) длится несколько дней, а при высоких температурах (37°C) — несколько минут. Однако *in vivo* период полужизни комплексов, оцененный по убыванию гормональной радиоактивности, составляет 4—8 час. (Jensen, Jacobson, 1962). D. Williams, G. Gogski (1973) также отмечают низкую скорость диссо-



циации в опытах по высвобождению при 37°C радиоактивного гормона из клеток, предварительно инкубированных им.

Исследования С. Raynaud-Jammet, E. E. Baulieu (1969), В. Arnaud (1971), S. Mohla et al. (1971) показали, что ядерную РНК-синтезирующую способность может активировать только трансформированный в 5S-форму гормон-рецепторный комплекс. S. Mohla et al. (1971) также наблюдали увеличение РНК-синтезирующей активности ядер только при инкубации трансформированным в 5S-форму рецептором. 5S-трансформированный рецептор-эстрадиоловый комплекс, выделенный 0,3 М КСI из ядер, предварительно инкубированных в цитоплазме в присутствии эстрадиола, при повторной инкубации со свежими ядрами активирует их РНК-синтезирующую способность. Тканевая специфичность данного феномена подтверждается тем, что ядра, выделенные из почек и печени, при инкубации с трансформированной цитоплазмой из клеток матки значительно меньше синтезируют РНК, чем ядра из клеток матки.

Перед исследователями возник вопрос, каким образом происходит активирование РНК-синтезирующей способности ядер трансформированным в 5S-форму эстрадиол-рецепторным комплексом. Некоторые ученые считают, что акцепторным участком для связывания рецептор-гормонального комплекса является последовательность ДНК. В опытах Т. А. Musliner, M. G. Schader (1972) установлено связывание цитоплазматического стероид-рецепторного комплекса с очищенной двуцепочечной ДНК *in vitro*. В другой работе Т. А. Musliner, M. G. Schader (1971), разрушая ДНК ядер инкубированием в присутствии ДНК-азы, показали, что при последующей инкубации в смеси эстрадиол-цитоплазма ДНК не способны трансформировать 4S-рецептор в 5S-форму. Авторы считают, что ДНК-аза реагирует с акцепторным участком, связывающим гормон-рецепторный комплекс. В этих же условиях обработка ядер актиномицином Д не влияет на трансформацию цитоплазматического рецептора в ядерный рецептор. Авторы предположили, что последовательности ДНК могут служить основным ядерным акцептором связывания цитоплазматического рецептора. Другие компоненты ядра (кислые белки, гистоны) могут определять специфичность связывания в последовательности ДНК. Насыщающее связывание последовательностями ДНК рецепторного комплекса эстрадиола было установлено также многими другими исследователями (Clemens, Kleinsmith, 1972; Yamamoto, Alberts, 1972; Toft, 1972; Musliner, Schader, 1972; King, Gordon, 1972).

S. Liao et al. (1973) указывают, что последовательности РНК также могут связывать эстрадиол-рецепторный комплекс цитоплазмы.

Опыты S. Higgins et al. (1973) свидетельствуют об акцепторной роли кислых белков хроматина в связывании цитоплазматического гормон-рецепторного комплекса. Было показано, что обработка ДНК-азой не меняет специфическое акцептирование цито-



плазматического эстрадиол-рецепторного комплекса, напротив, обработка ядер клеток матки проназой привела к неспецифическому связыванию рецепторного комплекса, которое оценивалось методом G. Sketchard (1949).

На акцепторную роль кислых белков хроматина в связывании рецепторных белков указывают исследования T. C. Spelsberg et al. (1971, 1972). Авторы установили, что цитоплазматический прогестероновый рецептор из яйцевода цыплят связывается интактным хроматином яйцевода или хроматином специально экстрагированным и заново реконструированным. Оказалось, что гормон-рецепторный комплекс связывается с определенной фракцией кислых

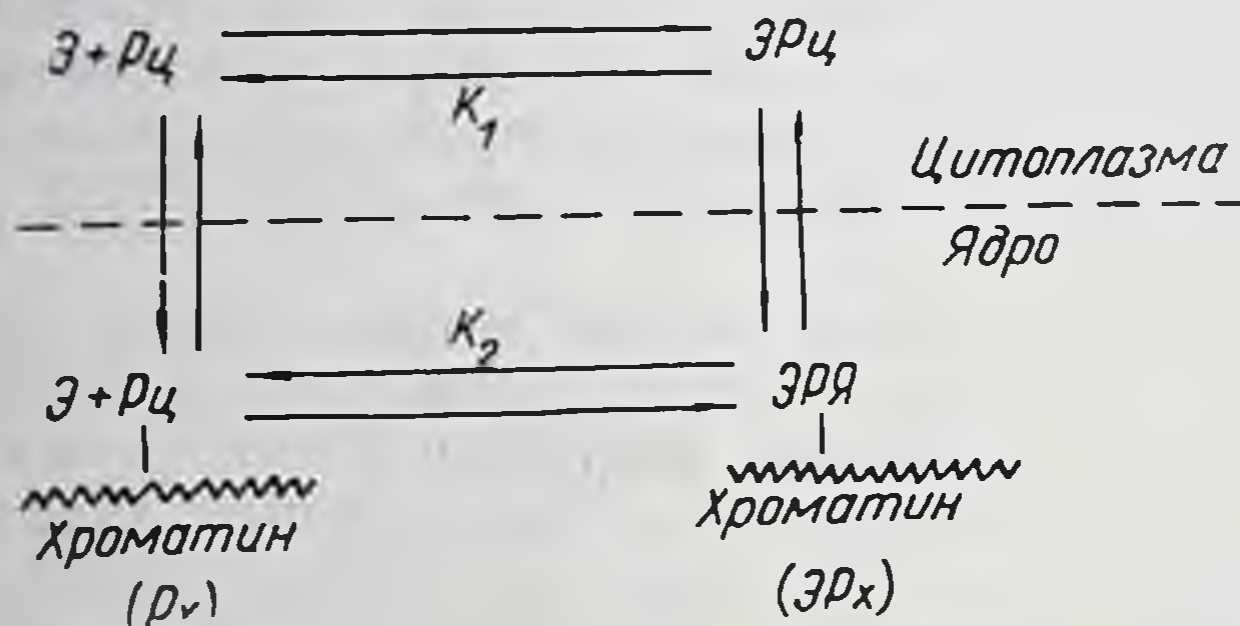


Рис. 10. Схема взаимоотношений эстрадиола со связывающими его субстанциями в клетке (по Williams, Gorski, 1973)

белков, обозначенной как АРЗ-фракция. Связывание рецептора с кислыми белками хроматина происходит независимо от эстрадиола.

M. L. Chatkoff et al. (1974), исследуя параметры равновесия свободного рецептора эстрадиола и эстрадиол-рецепторного комплекса с хроматином, также пришли к выводу, что для связывания рецептора с хроматином эстрадиол не нужен, поскольку он не меняет параметров равновесия свободного рецептора с хроматином. Параметры равновесия свободного рецептора и комплекса рецептор-эстрадиол одинаковы.

Исследования взаимоотношений эстрадиола со связывающими его субстанциями были суммированы и представлены в схематическом виде D. Williams, G. Gorski (1972) (рис. 10).

Как видно из рис. 10,  $K_1 = K_2$ , т. е. скорость диссоциации гормон-рецепторного комплекса цитоплазмы, равна скорости диссоциации эстрадиола из ядерного рецептор-хроматинового комплекса. При  $22^\circ\text{C}$  кинетика этих реакций одинакова, однако измерение периода полужизни цитоплазматических и ядерных рецепторов эстрадиола при  $37^\circ\text{C}$  показало, что ядерный гормон-рецепторный комплекс, связанный с хроматином, более стабильный и обладает большим периодом полужизни (Sala-Trepat, Reti, 1974).

Как было отмечено выше, 5S-ядерный рецептор активно усиливает ядерную транскрипцию, а 8S-рецептор — эстрадиоловый комплекс цитоплазмы — не влияет на транскрипцию (Bezial et al., 1970; Arnaud-Jammet, 1971; Mohla et al., 1971).

Согласно данным S. Mohla et al. (1971), при усилении синтеза РНК в ядре трансформированным 5S-эстрадиол-рецепторным комплексом происходит значительное увеличение как «растворимой», так и «агрегированной» РНК-полимеразной активности (РНК-полимеразы II и I соответственно). Основываясь на опытах, авторы предположили, что по крайней мере часть наблюдаемого феномена увеличения ядерной транскрипции происходит независимо от изменения матричной функции хроматина, т. е. депрессии хроматина.

Исследования К. Р. Cox et al. (1973) четко показали модификацию хроматина ядер после введения эстрогена, когда на хроматине появляются дополнительные участки связывания для РНК-полимеразы II.

Предположение о гормональной регуляции РНК-полимеразной активности подтверждается экспериментами по влиянию гормон-рецепторных комплексов на РНК-полимеразную систему (Bezial et al., 1970; Arnaud et al., 1971). Добавление диссоциированного в 4S-форму и затем трансформированного в 5S-форму рецепторного комплекса, экстрагированного из ядра 0,4 М КСl, к ядрам эндометриума телят увеличивает активность выделенной из этих ядер РНК-полимеразы I. Степень изменений РНК-синтезирующей активности ядер под действием трансформированного 5S-гормон-рецепторного комплекса (50—200%) *in vitro* соответствует действию гормона *in vivo*, но неизмеримо выше по сравнению с индуцируемой новой иРНК, кодирующей специфический белок (Jensen, De Sombre, 1972). Одноразовая инъекция эстрадиола в опытах на неполовозрелых цыплятах предпочтительно повышает активность РНК полимеразы I по сравнению с РНК-полимеразой II.

Согласно S. P. Blattin et al. (1970), РНК-полимераза I участвует в транскрипции ядрышковых генов (генов рибосомальной РНК), тогда как РНК-полимераза II транскрибирует последовательности нуклеоплазматических генов (генов синтеза иРНК). Предпочтительное повышение активности РНК-полимеразы I по сравнению с РНК-полимеразой II при действии эстрогенов на матку крысы обнаружено также W. G. P. Mainwaring et al. (1971), E. A. Smuckler, J. R. Tata (1971), F. Yu, P. Feigelson (1971).

Используя обнаруженный E. W. Johns, S. Forrester (1969) факт о совместной экстракции из ядер 0,3 М NaCl 5S-рецептора эстрадиола и РНК-полимеразы, а также данные по идентичности сродства этих белков с хроматином, M. Mousseron-Cannet et al. (1971 a, b) показали, что 5S-рецептор-эстрадиоловый комплекс связывается с ядрышковой РНК-полимеразой I.



Опыты С. Müller et al. (1974) также показывает комплексообразование между очищенной РНК-полимеразой I и ядерным рецептором диэтилстилбестрола, выделенного из яйцевода неполовозрелых цыплят.

Анализ приведенных литературных данных по механизму действия эстрогенов и прогестиннов в тканях-мишенях позволяет сделать следующее заключение. Эти стеронды, также как глюкокортиконды, проникают в клетку. В цитоплазме они связываются специфически с рецепторными молекулами белков с коэффициентами седиментации 4S или 8S в зависимости от ионной силы экстрагирующего раствора. Неизвестно, является ли 4S-форма субъединицей 8S-формы или результатом ее конформационных изменений. 4S-рецептор-гормональный комплекс в ядре трансформируется в 5S-ядерный рецептор. 5S-рецептор может акцептироваться хроматином, последовательностями ДНК или определенными фракциями кислых белков хроматина, а также РНК-полимеразой I. При акцептировании ядерного рецепторного комплекса меняется матричная функция хроматина путем создания благоприятных условий для присоединения РНК-полимеразы II, транскрибирующей последовательности ДНК, участвующей в синтезе иРНК. Возможно, при специфическом связывании ядерного рецептора с РНК-полимеразой I возникает аналогичная ситуация. Результатом этих превращений гормон-рецепторного комплекса является как усиление синтеза рРНК, так и индукция синтеза новой иРНК.

## Андрогены

Исследование связывания андрогенных стероидов затруднено тем, что во всех тканях, куда эти гормоны непосредственно проникают, они включаются в метаболические процессы, взаимодействуют с различного рода стероидредуктазами и стероиддегидрогеназами (Williams-Ashman, Reddi, 1972). Эти ферменты метаболизируют тестостерон даже в изолированных ядрах, поскольку 5S-стероидредуктаза находится как в нуклеозоле, так и в связанном состоянии с хроматином ядер простаты (Bruchovsky, Wilson, 1968; Anderson, Liao, 1968). Превращение стероидов в изолированных ядрах различных тканей хорошо демонстрируется табл. 7.

Некоторые исследователи, анализируя внутриклеточные и внутриядерные превращения тестостерона, полагают, что в отдельных тканях-мишенях андрогенов именно дигидротестостерон является действующим началом гормона в регуляции синтеза ДНК, РНК индуцируемых ферментов и различных морфогенетических признаков, таких как вторичные половые признаки (Williams-Ashman, 1969, 1970; Fang, Liao, 1969; Gloina, Wilson, 1969; Fang et al., 1969). Этот вопрос подробно освещается в обзорах Н. С. Williams-Ashman, А. Н. Reddi (1971, 1972).

Исследования, проведенные в последние годы, выявили, что в ядрах и цитоплазме клеток вентральной простаты крыс содер-

жатыся макромалекулы, специфически связывающие дигидротестостерон. Эти макромалекулы являются белками, поскольку обработка ДНК-азой и РНК-азой не влияет на характер и специфичность связывания, тогда как трипсин и проназа полностью разрушают гормон-макромалекулярную связь (Bruchovsky, Wilson, 1968; Unhjem et al., 1969).

S. Fang et al. (1969) определили, что дигидротестостеронсвязывающий белок экстрагируется из ядер простаты животных 0,4 М КСl, содержащей ЭДТА. Анализ этого белка на плотности сахарозного градиента показал, что рецептор дигидротестостерона имеет коэффициент седиментации 3S. Оказалось, что в цитоплазме клеток вентральной простаты также имеется дигидротестостеронсвязывающий белок с незначительно большей константой седи-

Таблица 7

Задержка радиоактивности изолированными ядрами различных тканей при инкубации  $H^3$ -тестостероном в течение 30 мин. при 37°C (Williams-Ashman, Reddi, 1972)

Ткани, из которых выделены ядра	Радиоактивность ядер, и.м.п./мин/100 мкг/ДНК	Распределение радиоактивности, %		
		тестостерон	дигидротестостерон	андростендион
Мозг	105	96,2	2,8	0
Тимус	78	93,5	0	2,1
Диафрагма	53	78,2	2,1	17,6
Печень	60	73,4	0	4,5
Вентральная простата	1250	17,3	78,2	1,0

ментации (3,5S). Если выделять ядра из клеток простаты кастрированных крыс и затем инкубировать в среде, содержащей  $H^3$ -тестостерон или  $H^3$ -дигидротестостерон, гормоны не проникают в ядерные структуры и не связываются с ядром. Если же инкубацию таких ядер проводить в цитоплазме, содержащей  $H^3$ -тестостерон или  $H^3$ -дигидротестостерон, то эти гормоны проникают в ядро и связываются с ним, о чем свидетельствует экстрагированный из ядер 0,4 М КСl ядерный гормон-рецепторный комплекс. Образование 3,5S-рецептора при добавлении меченого дигидротестостерона *in vitro* в цитоплазму происходит спонтанно при 0°C. Это свидетельствует о том, что дигидротестостерон сначала связывается с цитоплазматическим рецептором 3,5S и затем переходит в ядро. Оптимальная температура перехода — 37°C. При этом цитоплазматический рецептор трансформируется в 3S-форму и экстрагируется из ядра 0,4 М КСl, т. е. проникновение дигидротестостерона в ядро соответствует двухэтапному механизму проникновения эстрадиола в ядро, открытому Jensen et al. (1968).

Одновременно с S. Fang et al. (1969) W. G. P. Mainwaring открыл другой дигидротестостерон, связывающий рецептор цито-



плазмы вентральной простаты крыс, отличающийся коэффициентом седиментации (8S), что послужило толчком для дальнейших исследований цитоплазматических рецепторов 5S-дигидротестостерона.

В 1972 г. появился ряд сообщений, указывающих на существование двух форм цитоплазматических рецепторов для андрогенов (Ludens, Fanestil, 1971; Fang, Liao, 1971). Так, G. H. Ludens, D. D. Fanestil при фракционировании цитоплазмы клеток почек гельфильтрацией в сефадексе Г-100 обнаружили  $H^3$ -альдостеронсвязывающую фракцию. Молекулярный вес рецептора  $H^3$ -альдостерона, равный 50 000, измерен по формуле

$$M_{\text{вес}} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0),$$

где  $V_e$  — объем элюции рецепторного комплекса;

$V_t$  — общий объем гели, определенный использованием  $H^3$   $O_2$ ;

$V_0$  — мертвый объем колонки, определенный декстраном синим.

Фракционирование  $104\ 000 \times g$  супернатанта, полученного при томогенизации ткани в 0,25 M сахарозе, выявило другую форму  $H^3$ -альдостеронсвязывающего рецептора с молекулярным весом  $1,5 \cdot 10^6$ . Авторы объясняют наличие двух форм связывания  $H^3$ -альдостерона в цитоплазме почек существованием переходного этапа из одной формы в другую, поскольку в процессе такого перехода связанный альдостерон не диссоциирует.

S. Fang, S. Liao (1971), осаждая белки цитоплазмы простаты крыс, которым был введен  $H^3$ -5 $\alpha$ -дигидротестостерон, сульфатом аммония, выявили две фракции, способные специфически связывать гормон. Одна из фракций осаждалась при 0—40%-ном насыщении сульфатом аммония, другая — при 55—75%-ном. Эти фракции назвали неочищенными рецепторными комплексами II и I соответственно. При гельфильтрации в сефадексе Г-200 также можно отдельно получить эти комплексы. При этом комплекс I задержится, а комплекс II быстро элюируется из колонки. Комплекс I (55—75%-ное насыщение или II пик гельфильтрации) при центрифугировании в плотности градиента сахарозы седиментируется в области 3—3,5S в отсутствие KCl. Коэффициент седиментации комплекса II (0—40%-ное насыщение или I пик гельфильтрации) в этой работе не определялся.

Анализом специфичности связывания рецепторного комплекса I 5 $\alpha$ -дигидротестостерона цитоплазмы простаты крыс выявлено, что этот рецепторный комплекс успешно связывает  $H^3$ -5-тестостерон, в меньшей степени женские половые гормоны,  $H^3$ -прогестерон и  $H^3$ -17 $\beta$ -эстрадиол. Во всех случаях константа седиментации рецептора I остается в пределах 3—3,5S. В то же время комплекс II (0—40% насыщения) показывает чрезвычайно высокую степень связывания с  $H^3$ -5 $\alpha$ -дигидротестостероном. В экспериментальных условиях меченый тестостерон, 17 $\beta$ -эстрадиол, прогестерон или

кортизол в концентрациях  $10^{-6}$ — $10^{-8}$  М не связываются с комплексом II. Ни один из исследованных немеченых гормональных конкурентов, примененных в большом избытке (5-дигидротестостерон, тестостерон, андростендион,  $5\beta$ -андростан-3,17-дион-3 $\alpha$ -,  $17\beta$ -дигидродион,  $5\alpha$ -андростан, кортизон,  $17\beta$ -эстрадиол и прогестерон), не в состоянии конкурировать с  $H^3$ - $5\alpha$ -дигидротестостероном за связывание с рецепторной фракцией II.

Дальнейшие опыты S. Fang и S. Liao (1971) выявили, что именно гормон-рецепторный комплекс II связывается с ядерными компонентами, из которых затем элюируется 0,4 М КСI в виде 3—3,5S-частицы.

Таким образом, исследования выявили наличие в цитоплазме клеток-мишеней для  $5\alpha$ -дигидротестостерона двух типов рецепторных молекул, один из которых строго специфичен к данному гормону, а второй (3—3,5S) наряду с  $5\alpha$ -дигидротестостероном связывает и другие мужские и женские половые гормоны.

Интересные данные по механизму генотропного действия андрогенов были получены M. F. Lyon, S. G. Hawkes (1970), U. Tettenbohn (1971). Авторы изучали Tm-мутацию, вызывающую у мышей наследственную нечувствительность к андрогену и, как результат, — нарушение развития семенников, так называемую тестикулярную феминизацию. Мутанты с мужским каротипом XV имеют фенотип самок. При этой мутации на ткани-мишени перестают действовать дигидротестостерон и его внутриклеточные производные (в частности  $5\alpha$ -андростан-3 $\alpha$ - $17\beta$ -диол). Обычно гормон вызывает резкое увеличение активности  $\beta$ -глюкоронидазы и алкогольдегидрогеназы в проксимальных канальцах почек кастрированных самок и самцов мышей, но не влияет на уровень этих ферментов в других тканях.

При дальнейшем биохимическом изучении выяснилось, что в цитоплазме Tm-мутантов почти полностью отсутствует белок — рецептор тестостерона с коэффициентом седиментации 3—3,5S (Gehring et al., 1971). Анализируя эти данные, P. B. Хесин (1972) предполагает, что ген Tm является геном-регулятором, а его продукт (рецепторный белок для тестостерона) — белком регулятором в комплексе с гормоном, включающим в тканях-мишенях ряд структурных генов, например, генов алкогольдегидрогеназы и  $\beta$ -глюкоронидазы.

Предположение, что гормон-рецептирующие белковые молекулы могут являться продуктами гена регулятора, следовательно, регуляторными белками, способными при акцептировании соответствующего гормонального лиганда связываться с операторным участком оперона, подтверждается и последующими работами.

A. K. Roy et al. (1974), исследуя механизм специфической андрогенной индукции синтеза  $\alpha_2\gamma$ -глобулина в печени крыс, установили присутствие в цитоплазме печени рецепторных молекул для дигидротестостерона и тестостерона с коэффициентом седиментации 3,5S. Оказалось, что этот рецептор обладает еще большим



сродством к  $17\beta$ -эстрадиолу. Эстрадиол строго конкурирует в связывании тестостерона и  $5\alpha$ -дигидротестостерона с рецептором, тогда как последний незначительно препятствует связыванию эстрадиола. Тем не менее, роль этого рецептора в индукции синтеза  $\alpha_2\gamma$ -глобулина андрогенами значительная, поскольку при андрогеннечувствительном псевдогермафродитизме крыс самцов  $\alpha_2\gamma$ -глобулин не индуцируется введением  $5\alpha$ -дигидротестостерона. В основе этого явления лежит отсутствие цитоплазматического 3—3,5S-рецептора андрогенов (Milin, Roy, 1973). Авторы полагают, что синтез  $\alpha_2\gamma$ -глобулина контролируется посредством взаимодействия андрогенов с описанным рецептором позитивно и эстрогенами негативно. Связывание эстрогенов с рецептором андрогенов приводит к потере этим рецептором способности акцептироваться хроматином, точнее операторным участком оперона синтеза  $\alpha_2\gamma$ -глобулина.

Сведения относительно действия андрогенов хотя и разноречивы, но указывают, что эти гормоны, также как и другие стероиды, могут реализовать свое действие через двухэтапный механизм взаимодействия с внутриклеточными структурами. Детальные исследования механизма генотропного действия этих гормонов пока не проведены. В частности, в отличие от эстрогенов в случае андрогенов открытыми остаются вопросы внутриядерного акцепторного участка рецепторных комплексов, изменения матричных свойств хроматина и взаимодействия этих активных комплексов с РНК-полимеразами.

Литературные данные, касающиеся действия стероидных гормонов, в целом показывают строгую специфичность действия этих гормонов в индукции синтеза определенных белков, ферментов и их информационной РНК, т. е. специфическую активацию отдельных генов, а также системную активацию общего синтеза белков цитоплазмы и всех классов РНК. Несмотря на это, в основе восприимчивости клетки к действию стероидов и тиреоидных гормонов, как далее будет показано, может лежать элементарный механизм: первичное образование специфического гормон-рецепторного комплекса. Лишь при его участии гормон может повлиять на активность генетического аппарата гормончувствительной клетки. Гормончувствительность клетки в этом плане в свою очередь обусловлена наличием специфической рецепторной молекулы, т. е. детерминированностью генетического аппарата клетки, настроенного в процессе дифференцировки на синтез специфического рецептора.

Однако в многоклеточном организме синтез соответствующих белков направляет развитие клетки под действием гормонов. В некоторых клетках, обычно компетентных действию одного гормона, могут находиться рецепторные молекулы и для другого гормона, обладающего противоположным действием. Об этом свидетельствуют исследования Н. А. Юдаева и Б. В. Покровского (1969—1974), доказывающие непосредственный генотропный эффект андрогенов на матке крысы, а также наличие специфических рецепторов



для мужских половых стероидов в цитоплазме клеток матки (Jungblut et al., 1971).

Необходимо отметить важную роль в регуляции генетической активности конкуренции различных по действию гормонов за связывание одним и тем же рецепторным белком (Roy et al., 1974), биологическое значение которой обсуждалось выше.

### ВНУТРИКЛЕТОЧНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ И СПЕЦИФИЧЕСКОЕ СВЯЗЫВАНИЕ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ

Условием генотропного действия тироксина является его проникновение внутрь клеток, поскольку механизм действия этого гормона, также как и стероидов, не опосредован усилением аденилатциклазной активности клеточных мембран (Robinson et al., 1971). В некоторых случаях в определенных тканях тиреоидные гормоны увеличивают аденилатциклазную активность, например, в жировой ткани и в ткани сердца (Krishna, 1968; Levey, Epstein 1969). Увеличение содержания 3', 5'-циклической АМФ-наблюдаемое при гипертиреозе, не подтверждается в опытах с перфузией сердца различными концентрациями тиреоидных гормонов (Sobel et al., 1969). Влияние тиреоидных гормонов на аденилатциклазную активность в данном случае опосредованное.

Анализируя литературные данные, E. W. Sutherland et al. (1971) пришли к выводу, что действие тиреоидных гормонов на внутриклеточные процессы и на генетическую активность не опосредовано открытым ими механизмом регуляции аденилатциклазной активности. Напротив, данные, полученные N. D. Lee, R. H. Williams (1954), показывают, что примерно 8% введенного животному тироксина концентрируется в печени, причем 40% метки локализуется в митохондриях.

По данным H. Shimada (1963), 10—25% меченого тироксина, накапливающегося в печени, содержится в ядрах, 20—30% — в митохондриях, 30—40% — в микросомальной фракции. Введение меченого тироксина гипотиреоидным животным, по данным F. L. Hoch (1967), приводит к 550-кратному увеличению содержания данного гормона в митохондриях печени в течение 3 час. после инъекции. Возможные механизмы аккумуляции тиреоидных гормонов подробно описаны в работе А. И. Гагельганс и др. (1972).

Интенсивное поглощение меченого тироксина различными тканями и внутриклеточными компонентами указывает на наличие активного транспорта и, очевидно, обусловлено существованием механизмов, связывающих эти гормоны. По-видимому, существуют внутриклеточные белки, специфически связывающие тиреоидные гормоны (Tata, 1958; Lissitzky et al., 1960; Ingbar, Freinkel, 1960). J. Tata (1958), S. Mante-Bouscayrol et al. (1962) из экстракта мозга крыс и кроликов и скелетной мышцы выделили такой белок. В отличие от тироксинсвязывающих белков сыворотки внутриклеточные тироксинсвязывающие белки обладают высо-



кой специфичностью к каждому гормону в отдельности в растворимых белках печени, но связывающее сродство их намного меньше, чем у сывороточных белков как по отношению к тироксину, так и трийодтиронину (Tata, 1957, 1960; Lissitzky, 1960).

S. Hamada et al. (1966), разделяя  $40\ 000\times g$  супернатант цитоплазмы печени крыс колоночной хроматографией и гельфильтрацией, выявили одну тироксинсвязывающую и одну трийодтиронинсвязывающую фракции.

В опытах по инкубированию  $105\ 000\times g$  супернатанта цитоплазмы печени крыс меченым  $J^{131}$ -тироксином и трийодтиронином с последующим фракционированием в ДЭАЭ целлюлозе и сефадексе Г-100 подтвердилось, что тироксин и трийодтиронин связываются с различными белковыми фракциями. Молекулярный вес каждой из этих фракций много выше  $100\ 000$ . Сродство специфического рецептора к трийодтиронину выше, чем к тироксину (Hamada et al., 1966). На основании этих данных авторы пришли к выводу, что специфические внутриклеточные рецепторы тиреоидных гормонов могут играть определенную роль в их транспорте.

Исследования внутриклеточных тироксинсвязывающих белков (Туракулов, Мирахмедов, 1972) с добавлением меченого тироксина к цитоплазматическому экстракту печени выявили две зоны активного связывания гормона при электрофорезе на полиакриламидном геле. Показано, что основная часть радиоактивности находится в  $\gamma$ -глобулиновой и преальбуминовой зонах белков, составляющих 19,7 и 3,9% от общего количества растворимых белков цитоплазмы печени, сильно отличающихся от специфических гормонсвязывающих белков сыворотки крови. При этом радиоактивность связанного тироксина составила для  $1\gamma$ -глобулина 59,3%,  $2\gamma$ -глобулина — 6,2% и  $18\gamma$ -глобулина — 34,5%. Остальные 15 фракций растворимых белков печени, выявляющиеся при таком методе разделения, радиоактивный гормон не связывали.

В другой серии опытов тиреоидэктомированным животным в течение 17—19 дней вводили по 10 мккюри  $T_4J^{125}$  и, таким образом, стабильный гормон в организме максимально заменили радиоактивным гормоном. Печень животных гомогенизировали в 0,25 М сахарозе и выделяли  $105\ 000\times g$  фракцию цитоплазматических белков. Эти белки фракционировали на колонке Г-75 и отдельные фракции исследовали на полиакриламидном геле. Гельфильтрацией в сефадексе Г-75 обнаружены 3 пика гормональной радиоактивности; последняя фракция обладает выраженной гормонсвязывающей активностью. Гормональный иод из этих фракций легко экстрагируется кислым бутанолом.

Электрофоретический анализ состава бутанолэкстрагируемого иода показал, что он на 8—15% состоит из тироксина, трийодтиронина и неорганического иода (Туракулов и др., 1974).

Интересные данные по связыванию тироксина с  $106\ 000\times g$  супернатантом клеток печени крыс были получены S. W. Spaulding, G. Davis (1971). Разгоняя предварительно инкубированную



с меченым тироксином цитоплазму самок крыс на электрофоретической установке с пластинкой 8%-ного полиакриламидного геля по методу S. W. Davis et al. (1970) и автордиографируя, авторы выявили, что меченый  $J^{125}$ -тироксин связывается с двумя зонами. В зоне с малой электрофоретической подвижностью имеются две тироксинсвязывающие полосы —  $S_1$  и  $S_2$ . В 14 случаях исследования цитоплазмы печени интактных крыс самцов в зоне медленной электрофоретической подвижности тироксин связывался только с  $S_2$ -фракцией. В зоне быстрой электрофоретической подвижности во всех случаях обнаруживается одна тироксинсвязывающая белковая полоска, названная авторами F-фракцией. По электрофоретической подвижности эта фракция соответствует сывороточному преальбумину. Однако специальные опыты выявили, что связывающие характеристики F-фракции отличаются от таковой сывороточного преальбумина. Тироксинсвязывающие  $S_1$ -,  $S_2$ - и F-фракции не денатурируются, устойчивы к нагреванию до  $60^\circ\text{C}$  в течение 10 мин. и перевариваются трипсином. Молекулярные веса этих белковых фракций — 13000, 95000 и 45000 соответственно.

Тироксинсвязывающая F-фракция выявлена также в цитоплазме кишечника, поперечнополосатых мышц и почек, тогда как  $S_1$  и  $S_2$ -фракции в этих тканях отсутствуют.

Исследования S. W. Spaulding, G. Davis (1970, 1971) указывают, что тироксинсвязывающие фракции обладают приблизительно одинаковым сродством как для тироксина, так и для трийодтиронина,  $S_1$  и  $S_2$  в отличие от F-фракции не связывают йодированных уксуснокислых аналогов этих гормонов. Связь тиреоидных гормонов с рецепторами не является ковалентной, что доказывается вытеснением меченых гормонов избытком немеченых гормонов, а также переходом гормональной метки  $S_1$ - и  $S_2$ -фракций на плазму крыс при перемешивании этих белков.

Исследования J. R. Tata (1968) выявили, что тиреоидные гормоны могут включаться на самых ранних стадиях развития головастиков. Включение меченого трийодтиронина в клетки зависит от длительности нахождения головастиков в воде, содержащей меченый гормон, и от стадии развития. Белки цитоплазмы, выделенные из гомогената головастиков поздней стадии развития, обладают большей гормонсвязывающей способностью на единицу веса по сравнению с белками, выделенными на ранней стадии развития. Увеличение связывания гормона с белками предшествует гормональной индукции синтеза РНК. Эти данные показывают, что белок, ответственный за связывание тироксина, появляется на очень ранних стадиях дифференцировки.

Нами было установлено, что рецепторный белок для тироксина в цитоплазматическом супернатанте  $105\,000\times g$  имеется на самых ранних стадиях развития куриного эмбриона. При разделении  $105\,000\times g$  супернатанта 5-дневных эмбрионов на полиакриламидном электрофореze выявлены 3 белковые фракции, аналогичные



$S_1$ -,  $S_2$ - и F-фракциям, связывающие тироксин; две из них выявляются в медленной зоне электрофоретической подвижности, а одна в быстрой зоне, причем по подвижности последняя аналогична преальбумину сыворотки (рис. 11). Такая же картина связывания наблюдается и с  $105\ 000 \times g$  супернатантом цитоплазмы мозга и печени 16-дневных куриных эмбрионов.  $NaJ^{125}$  не связывался ни с одной из этих фракций, а предварительное выключение функции щитовидной железы введением в эмбрион 4 мг 6-метилтио-

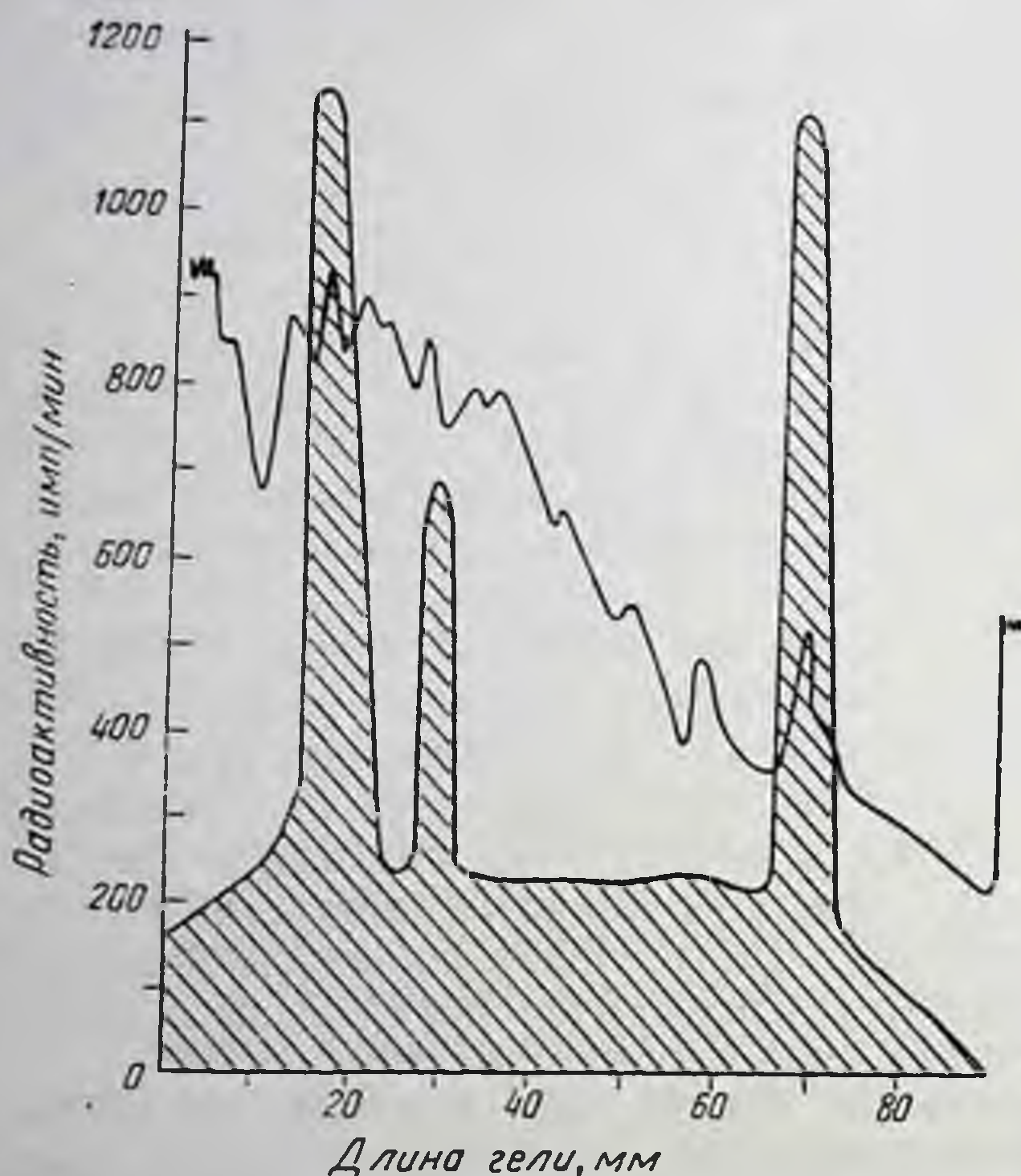


Рис. 11. Денситограмма электрофоретического разделения и радиоактивность (заштрихована)  $J^{125}$ -тироксина инкубированного  $105\ 000 \times g$  супернатанта цитоплазмы 5-дневных куриных эмбрионов

урацила на 8-й день развития приводило к трехкратному повышению связывания меченого тироксина с этими фракциями 16-дневных эмбрионов, что свидетельствует о специфичности связывания, поскольку 6-метилтиоурацил, согласно М. С. Мицкевичу (1957), подавляет образование тироксина. Таким образом создается экспериментальная модель истощения рецепторов гормонами.

Нами была сделана попытка выделить рецепторный белок для тироксина в  $200\ 000 \times g$  супернатанте цитоплазмы гомогената 5-дневных куриных эмбрионов.



Исследования по связыванию тироксина, меченного по  $J^{131}$ , с цитоплазмой проводили в колонках  $35 \times 500$  мм, заполненных сефадексом Г-200. Колонку уравнивали  $0,01 M$  фосфатным буфером с рН 7,4, содержащим  $10^{-6} M$  немеченого тироксина и меченого по  $J^{131}$ -тироксина в индикаторных дозах. Фракционирование белков цитоплазмы печени 5-дневных куриных эмбрионов на ко-

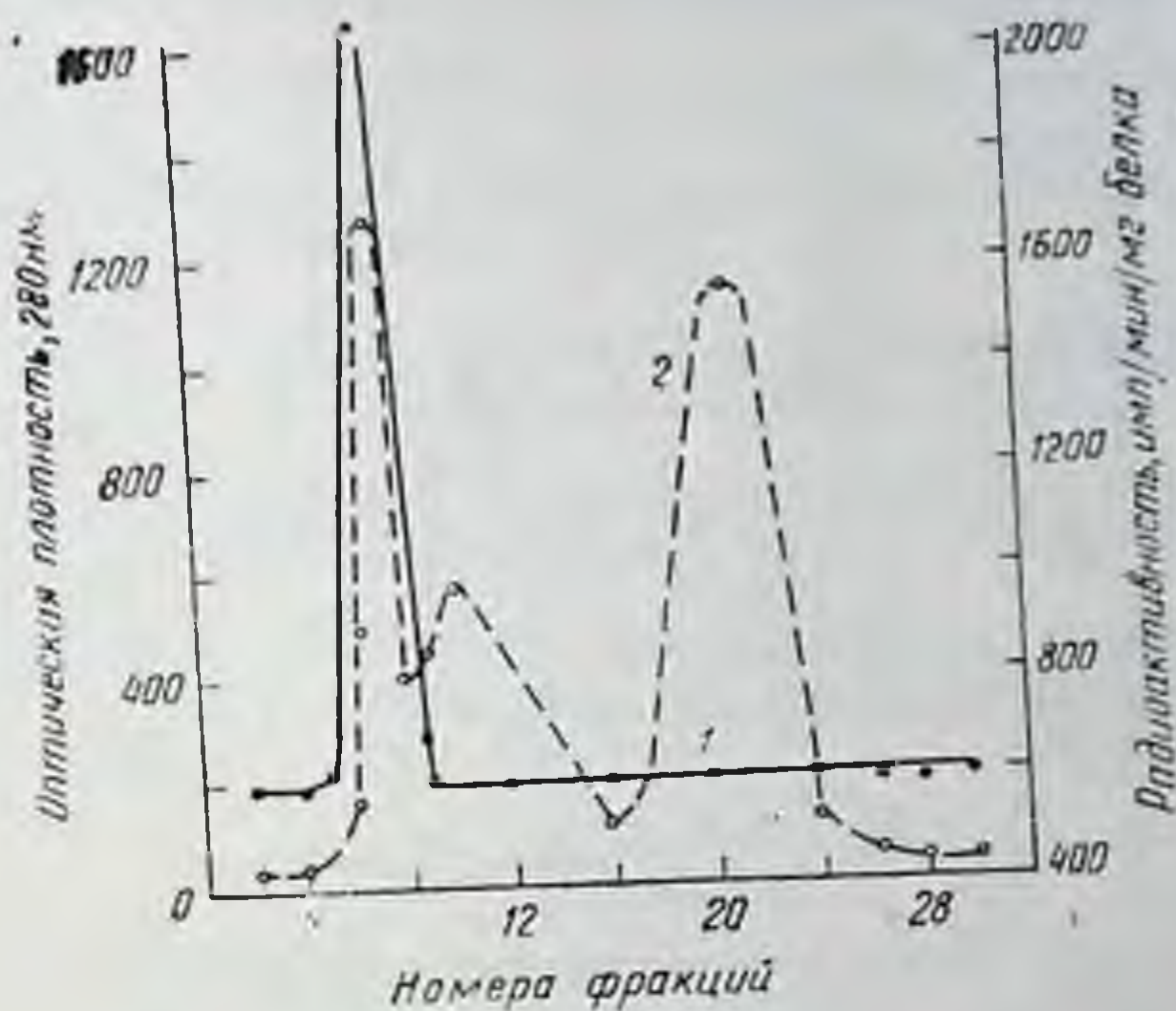


Рис. 12. Разделение гельфильтрацией в сефадексе Г-200 тироксинсвязывающей фракции цитоплазмы 5-дневных эмбрионов.

1—радиоактивность, 2—экстинкция белка.

лонке с сефадексом Г-200 выявило три белковые фракции, однако связывание меченого тироксина наблюдалось только в первом пике. При рехроматографии этих фракций в обратной последовательности в тех же условиях было подтверждено связывание тироксина именно этой фракцией (рис. 12).

Фракционирование белков цитоплазмы печени 20-дневных куриных эмбрионов и 6-месячных петухов на колонке в сефадексе Г-200 выявило также наличие трех белковых фракций. Однако в отличие от цитоплазмы гомогената 5-дневных эмбрионов, в этом случае связывают тироксин I и II фракции белков. Как характер профиля гельфильтрации, так и связывание меченого гормона 20-дневных куриных эмбрионов и 6-месячных петушков одинаковы, хотя  $200\,000 \times g$  супернатант цитоплазмы печени 6-месячных петушков был выделен после тщательной перфузии печени, что исключает попадание тироксинсвязывающих белков сыворотки крови.  $NaJ^{125}$  в условиях эксперимента не связывается ни с одной фракцией (рис. 13).



На основании изложенных данных можно предположить, что тироксинсвязывающие белки цитоплазмы синтезируются на ранних стадиях развития и уже на 5-й день инкубации обладают выраженной гормонсвязывающей способностью. На более поздних стадиях развития куриных эмбрионов появляется дополнительный тироксинсвязывающий белок (белки), который сохраняется и во взрослом состоянии. В отличие от электрофоретического разделения на полиакриламидном геле, при гельфильтрации на сефа-

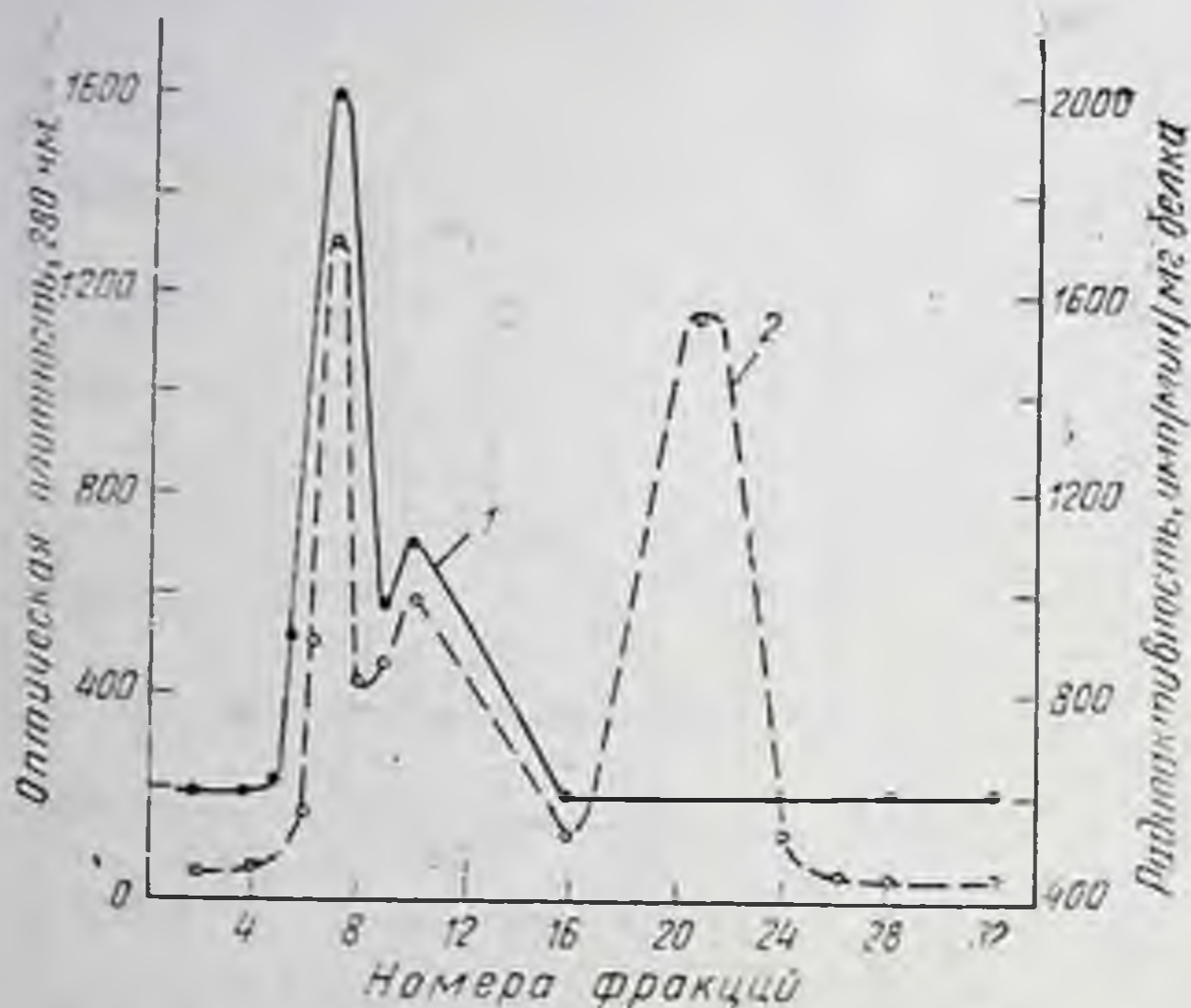


Рис. 13. Разделение гельфильтрацией в сефадексе Г-200 тироксинсвязывающих фракций цитоплазмы печени 20-дневных куриных эмбрионов и 6-месячных петухов.

1—радиоактивность, 2—экстинкция белка.

дексе не выявляется истинная картина тироксинсвязывающих белков, поэтому в настоящее время в нашей лаборатории проводится дальнейшая очистка этих фракций.

Разноречивость результатов исследований S. Hamada et al. (1966) и S. W. Spaulding, G. Davis (1971) относительно количества тироксинсвязывающих фракций, по-видимому, объясняется различными методами исследования. На это указывают также и результаты наших исследований с отдельным применением этих методов.

P. B. Sella et al. (1972) выявили, что меченый тироксин локализуется в клетках задней доли гипофиза. Недавно S. B. Sufi et al. (1973) описали физико-химические характеристики взаимодействия между тироксином, трийодтиронином и  $100\,000\times g$  цитоплазматическим супернатантом передней доли гипофиза свиней. Хотя авторы не фракционировали цитоплазму, все же, применяя метод

равновесного диализа и графически выражая полученные данные способом G. Scatchard (1949), определили константу связывания и емкость цитоплазмы для тироксина. Используя формулу для описания характера взаимодействия тироксина и очищенного преальбумина, предложенную A. Raz, D. Goodman (1969), они вычислили истинную концентрацию свободного и связанного с белками цитоплазмы тироксина и трийодтиронина. На основе полученных данных был построен график зависимости отношения  $\left[ \frac{\text{связанный}}{\text{свободный}} \right]$  от [свободный] для тироксина и для трийодтиронина. Ниже приводим расчет концентрации связанного и свободного гормона по A. Raz, D. Goodman (1969).

$$[\text{своб. } T_4] = \frac{[T_4] \times \text{имп/мин } 1 \text{ мл внешнего буфера}}{\text{общая радиоактивность буфера}}$$

$$[\text{связ. } T_4] = \frac{[T_4] \times \text{имп/мин } 1 \text{ мл внутреннего раствора}}{\text{общая радиоактивность буфера}} - [\text{своб. } T_4].$$

Если известен молекулярный вес рецептора, количество молекул гормона (в молях), связанное с молекулой рецептора, вычисляют по формуле

$$v = \frac{[\text{связ. } T_4]}{[\text{рецептор}]}$$

Применение графического выражения по G. Scatchard (1951) при описании взаимодействия макромолекул с низкомолекулярными лигандами может выявить константу сродства, емкость и количество типов связывающих участков рецепторов. Этот метод был широко применен при изучении взаимодействия стероидных гормонов со специфическими рецепторами (Baulieu, 1971; Higgins et al., 1973), а также при взаимодействии преальбумина с тироксином (Raz, Goodman, 1969; Pages, Edelchoch, 1973).

Опыты S. B. Sufi et al. (1973) показали, что в цитоплазме имеется два типа тироксинсвязывающих участков, один из которых обладает высоким сродством к тироксину, но низкой емкостью, а другой — низким сродством, но большой емкостью. Для связывающего участка специфического типа было установлено:

$$K_1 \text{ ассоциации} = 1 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1},$$

поскольку

$$K_1 \text{ диссоциации} = \frac{1}{K_1 \text{ ассоциации}},$$

$$K_1 \text{ диссоциации} = 1 \text{ нМ/литр.}$$

Как было отмечено в опытах F. L. Nosh (1967), инъекция гипотиреоидным животным незначительных количеств тироксина приводила к 550-кратному увеличению содержания данного гормона в митохондриях печени в течение 3 час. после инъекции.



Наши исследования (Туракулов и др., 1974) по взаимодействию изолированных митохондрий с тироксином *in vitro*, проведенные методом равновесного диализа с расчетом констант ассоциации графически по Скэтчарду, выявили, что в интактных митохондриях крыс имеется два типа тироксинсвязывающих участков: с высоким сродством и малой емкостью ( $K_a = 1 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ ;  $K_d = 10 \text{ нМ}$ ) и низким сродством и большой емкостью ( $K_a = 3,5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ ;  $K_d = 350 \text{ мкМ}$ ). При расчетах вводили поправку на сорбцию метки анализирующей посудой и на радиоактивность, соответствующую

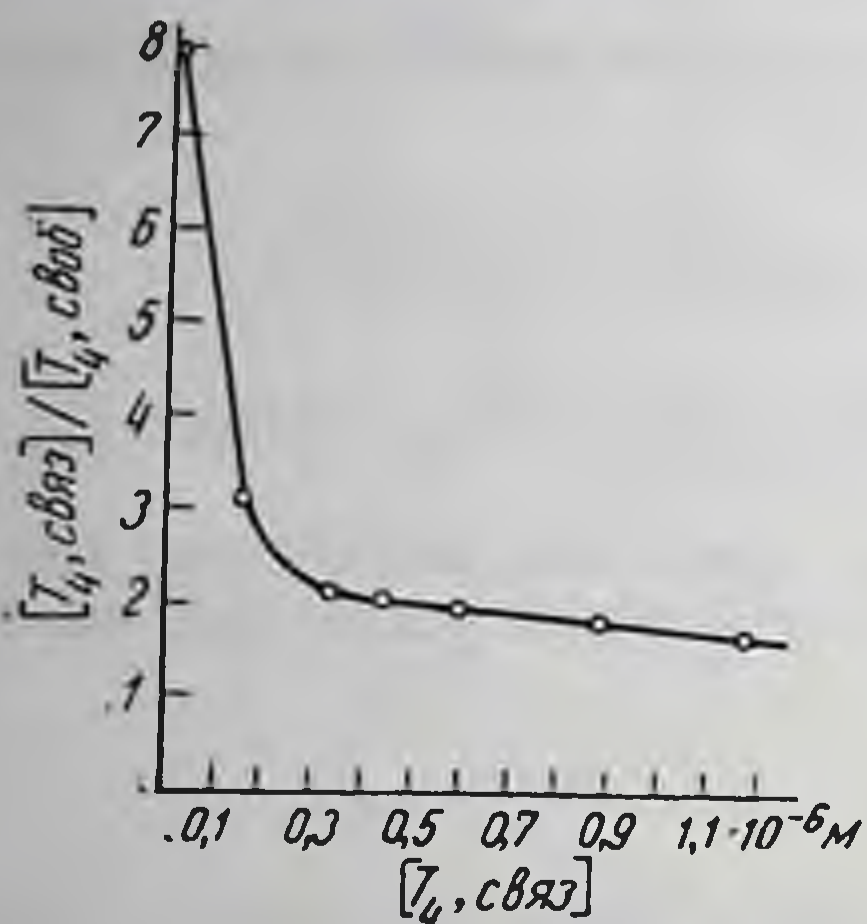


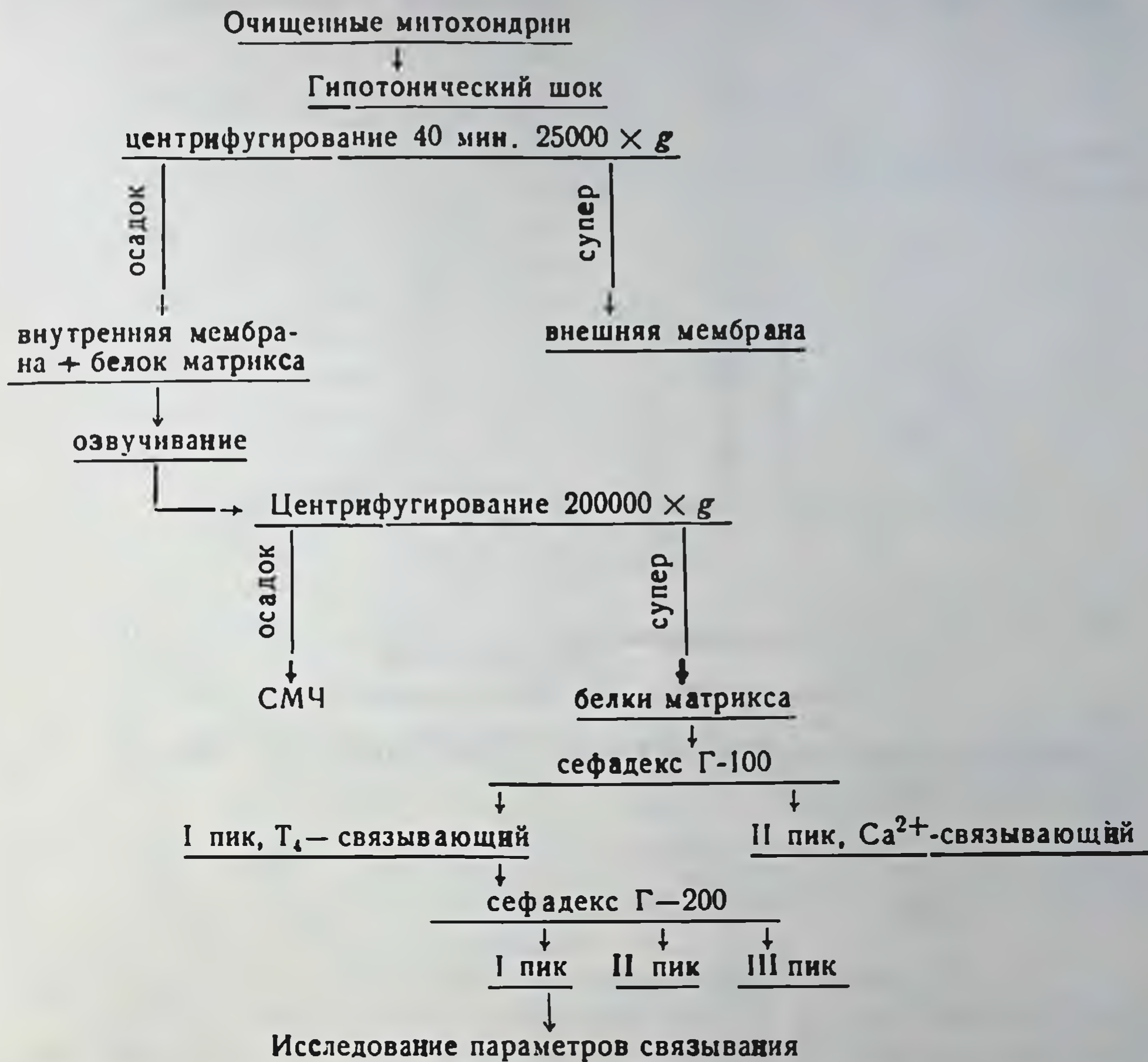
Рис. 14. Связывание  $J^{125}$ -тироксина изолированными митохондриями печени крыс (по Scatchard, 1949).

примеси йодида в препарате меченого тироксина (рис. 14). Среда инкубации при диализе содержала 0,3 М сахарозы, 10 мМ трис-хлорида, рН 7,5, от  $10^{-4}$  до  $10^{-9}$  М меченого тироксина, суспензию митохондрий (4 мг/100 мл по содержанию белка).

По литературным данным (Гагельганс и др., 1972), накопление тироксина в митохондриях происходит не только при введении данного гормона подопытным животным, но и в процессе непосредственной инкубации с изолированными митохондриями, которые поглощают от 1/3 до 4/5 общего количества гормона, находящегося в реакционной смеси (Hoch, Liptman, 1954; Tapley, Basso, 1959). Поглощение тиреоид-

ных гормонов изолированными митохондриями носит пассивный характер и не зависит от метаболизма, в частности, связывание тироксина происходит как при  $0^\circ$ , так и при  $20^\circ\text{C}$  и заканчивается практически за 1 мин. (Klempereger, 1955; Tapley, Basso, 1959). Исследования, проведенные в лаборатории Я. Х. Туракулова, свидетельствуют, что роль фосфолипидов в механизме связывания тироксина и трийодтиронина митохондриями представляется второстепенной: удаление около 80% фосфолипидов ацетоновой экстракцией практически не влияет на процесс связывания (Туракулов и др., 1971, 1972). Поэтому нами (Туракулов и др., 1974) была изучена тироксинсвязывающая способность растворимых белков матрикса митохондрий, которые получали из интактных митохондрий печени крыс, изолированных по общепринятым методам в среде, содержащей 0,3 М сахарозы и 10 мМ трис-хлорида рН 7,4, по предлагаемой схеме.

## Схема выделения белков матрикса митохондрий



Тироксинсвязывающую фракцию выделяли из супернатанта  $200\,000 \times g$ , обработанного ультразвуком «теней» внутренних мембран митохондрий, полученных путем осмотического шока. Обработку ультразвуком проводили на генераторе УЗДН-1 при 15 кГц и токе 0,3 ма в течение 2 мин. импульсами по 20 сек. при  $0-3^\circ\text{C}$ . Среда озвучивания содержала (в мкМ) сахарозы 100, АТФ—1, трис-хлорида—10 (рН 7,8),  $\text{MgCl}_2$ —5, сукцината—10,  $\text{KCl}$ —100. Тироксинсвязывающую фракцию озвученных «теней» митохондрий выделяли на колонке ( $2,5 \times 40$  см) с сефадексом Г-100, уравновешенной 5 мМ трис-буфера рН 7,5. При этом тироксинсвязывающая фракция выходила I пиком. II пик не обладал тироксинсвязывающей способностью (рис. 15). Дальнейшую очистку I пика и характеристику его тироксинсвязывающей способности проводили на колонке с сефадексом Г-200, уравновешенной 5 мМ трис-буфера, рН 7,5 и  $10^{-6}$  М  $J^{125}$ -тироксина. В полученных фракциях измеряли содержание белка по поглощению при 280 нм и радио-



активность в  $\text{имп/мин/мг}$  белка. Разделение первого пика Г-100 гельфльтрации на колонке с сефадексом Г-200 выявило наличие

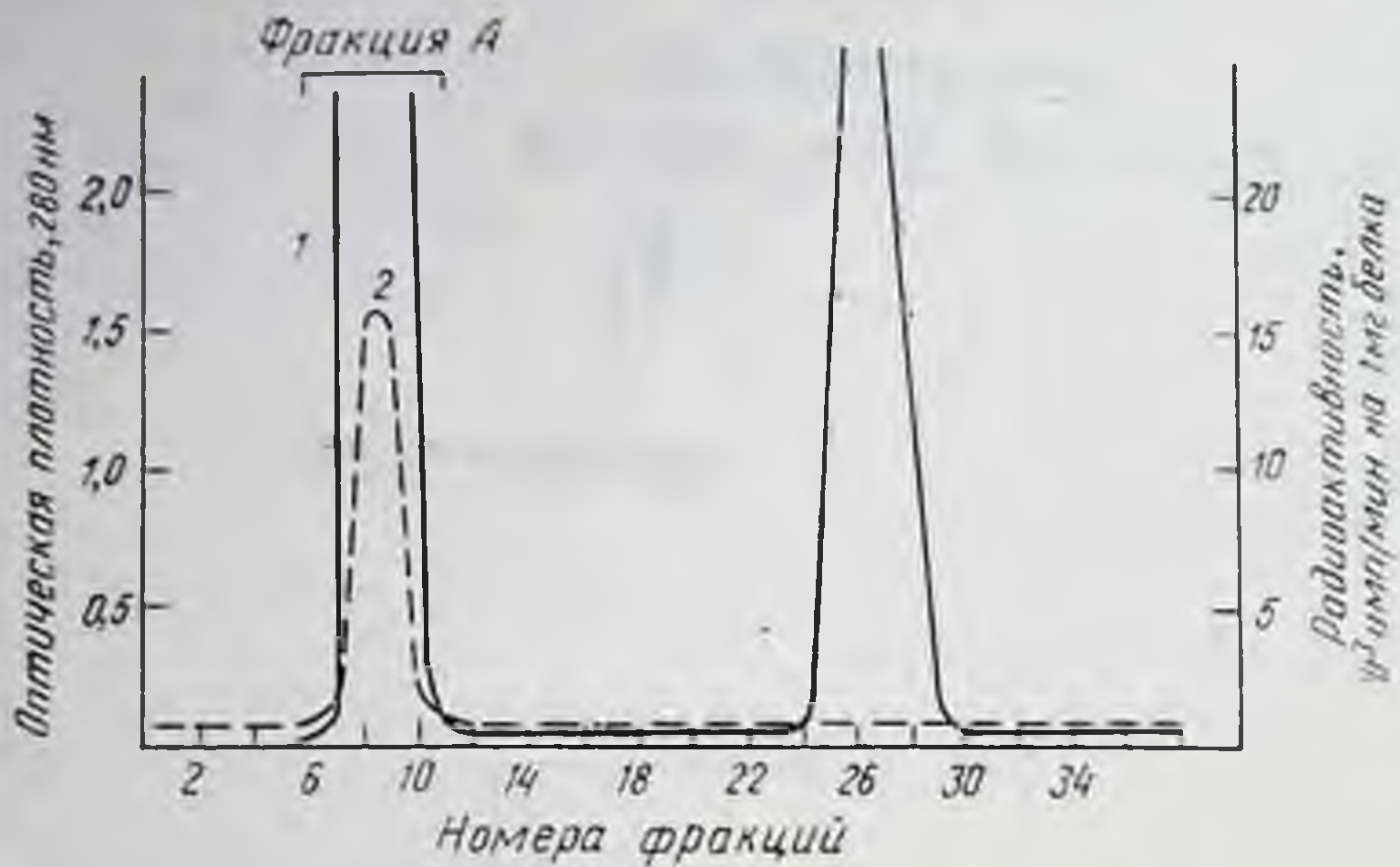


Рис. 15. Фракционирование белков матрикса митохондрий в сефадексе Г-100

1—поглощение при 280 нм, 2—радиоактивность ( $\text{имп/мин/мг}$  белка).

трех белковых фракций, однако связывание  $\text{J}^{125}$ -тироксина было только в I пике (рис. 16).

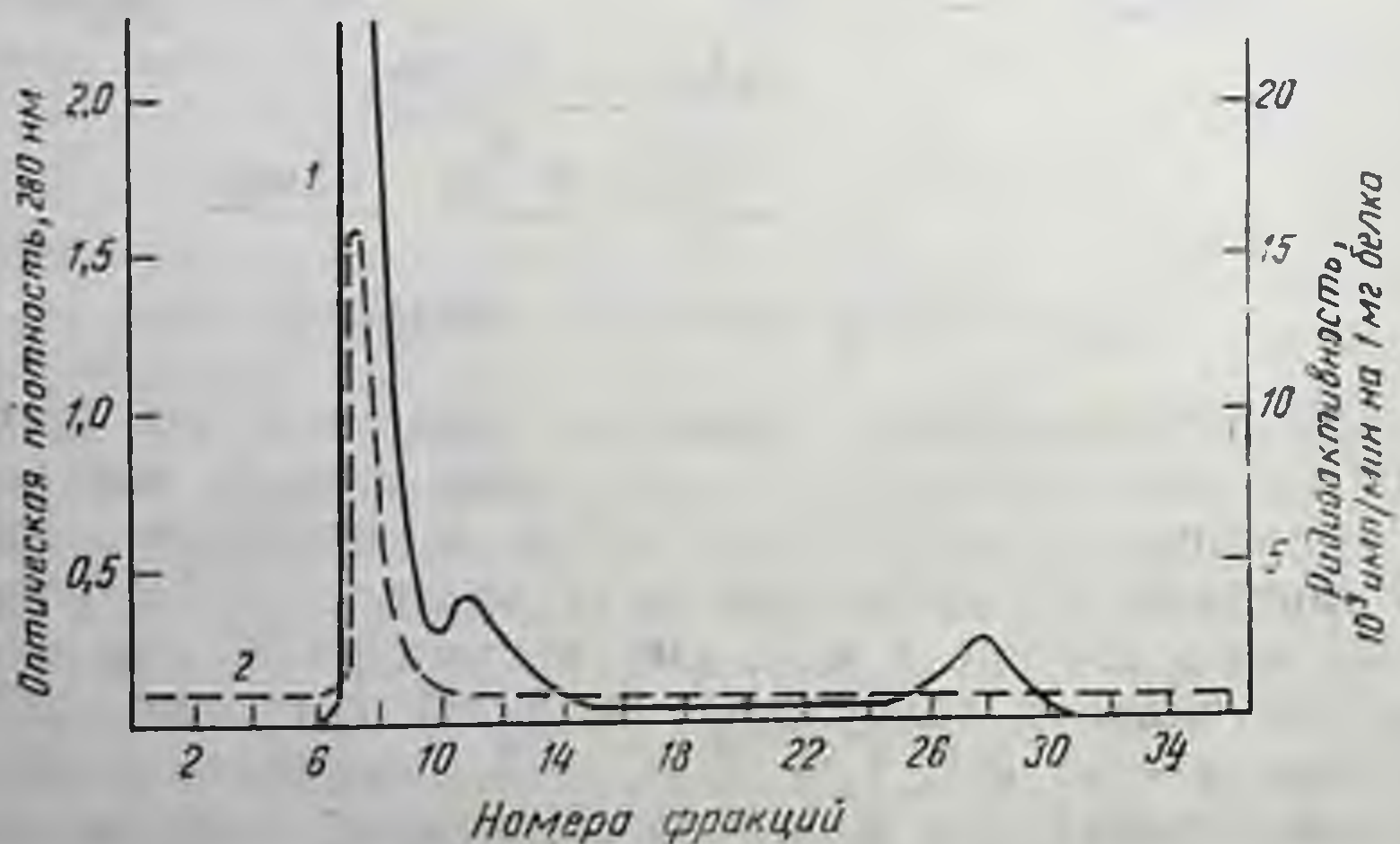


Рис. 16. Хроматография фракции А в сефадексе Г-200.

1—поглощение при 280 нм, 2—радиоактивность.

При рехроматографии всех трех фракций в обратной последовательности в тех же условиях было подтверждено связывание тироксина именно I пиком. Анализ связывания тироксина указанной фракцией в условиях, использованных для интактных мито-

хондрий, показал, что этот белок аналогично митохондриям имеет два типа связывающих участков: с высоким сродством и малой емкостью ( $K_1 = 3,5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ , следовательно,  $K_1 \text{ дис} \approx 3 \text{ нМ}$ ) и низким сродством, но большой емкостью ( $K_2 \text{ дис} = 8,1 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ , следовательно,  $K_2 \text{ дис} = 125 \text{ мкМ}$ ) (рис. 17).

Согласно Е. Е. Vaulieu et al. (1971), биологический смысл специфичности связывания рецепторов с гормональными лигандами (большого сродства и низкой емкости) заключается в обеспечении фиксации гормонов при их низкой физиологической концентрации и в ограничении этого процесса при патологическом повышении содержания гормона. В то же время тип связывания с низкой константой сродства и большой емкостью может служить своеобразной буферной системой, способной аккумулировать гормон в широких пределах концентраций. Очевидно, 500-кратное увеличение концентрации гормона тироксина в митохондриях при инъекции гипотиреоидным животным, описанное Ф. Л. Носч (1967), обеспечивается наличием в растворимых белках матрикса митохондрий рецепторных молекул с двумя типами связывания гормона.

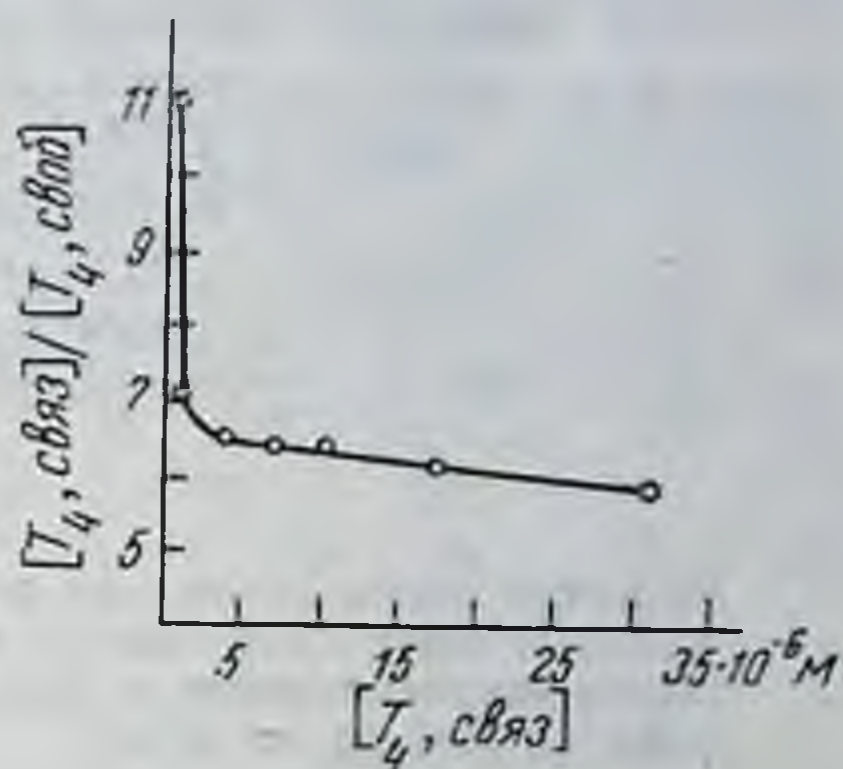


Рис. 17. Связывание  $J^{125}$ -тироксина с тироксинсвязывающей фракцией (по Scathard, 1949). Среда инкубации при диализе содержания: 5 мМ трихлорида (pH 7,5) от  $10^{-4}$  до  $10^{-9} \text{ M}$   $J^{125}$ -тироксина и тироксинсвязывающий фактор (4 мг белка на 100 мл).

Различие в константах сродства двух классов связывающих участков, по-видимому, обусловлено формированием различных типов связей между гормоном и белком. В частности А. Green et al. (1972) показали, что связывание тиреоидных гормонов с высоким сродством к глобулину сыворотки обеспечивается гидрофобными силами. Вместе с тем, неспецифическое связывание тироксина сывороточным альбумином происходит за счет электростатических сил между анионной частью молекулы гормона и катионными группами белка (Tabachnik, 1967).

Детальное исследование внутриклеточной локализации тиреоидных гормонов проводилось лишь в последние годы. Однако еще в 1970 г. Т. Винокурова обнаружила, что меченый тироксин, введенный *in vivo*, обнаруживается во фракции кислых белков хроматина печени крыс.

В последние годы установлено наличие насыщающихся трийодтиронинсвязывающих участков ядер клеток печени и почек (Orpenheimer et al., 1972, 1973; Surks et al., 1973). Исследователи установили, что введение чрезвычайно малых доз меченого трийодтиронина гипотиреоидным животным приводит к специфическому и



преимущественному связыванию гормона с хроматином. В то же время введение обычных доз гормона приводит к преимущественному связыванию трийодтиронина ядерной мембраной и растворимыми белками нуклеозола.

Подобные результаты были получены в результате инкубации мечеными гормонами культуры клеток гипофиза (Samuels, Tsai, 1973, 1973a, 1974).

Ранее широко обсуждалась роль цитоплазматических рецепторов в транспорте стероидных гормонов в ядерные структуры (Jensen, De Sombre, 1972), однако совершенно не изучено влияние цитоплазмы и ее тироксинсвязывающих фракций на транспорт гормонов в ядерные структуры.

Нами исследовано влияние предварительно инкубированной тироксином  $200\,000 \times g$  супернатанта цитоплазмы печени 20-дневных

Т а б л и ц а 8

Влияние предварительно инкубированного  $200\,000 \times g$  супернатанта цитоплазмы и ее фракций на связывание тироксина ядерными структурами (радиоактивность, *имп/мин/мг* белка ядер)

$T_4J^{131}$	$T_4J^{131}$ + цитоплазма	$T_4J^{131}$ + I пик	$T_4J^{131}$ + II пик	$T_4J^{131}$ + III пик
35	187	178	57	28
28	185	184	63	32
37	174	189	78	29
26	168	176	67	38
Процент связывания 4	15	16	6	5

куриных эмбрионов и отдельных тироксинсвязывающих фракций, выделенных гельфильтрацией этого супернатанта в сефадексе Г-200, на связывание тироксина ядерными структурами.

Связывание меченого тироксина с ядрами клеток печени куриных эмбрионов проводили на очищенных ядрах при  $4^\circ\text{C}$ , инкубируя суспензию ядер ( $10\text{ мг/мл}$  по белку) в  $0,3\text{ мл}$  фосфатного буфера рН 7,4, содержащего  $1,3 \cdot 10^{-6}\text{ М}$   $J^{131}$ -тироксина. В некоторых опытах  $200\,000 \times g$  цитоплазматический супернатант предварительно инкубировали  $1,3 \cdot 10^{-6}\text{ М}$   $J^{131}$ -тироксином, затем разделяли тироксинсвязывающую фракцию на сефадексе Г-200, как было описано ранее. После инкубации ядра промывали дважды суспендированием в буфере инкубации и центрифугировали при  $3000\text{ об/мин}$ , измеряли радиоактивность ядерного осадка (табл. 8).

Как видно из табл. 8, свободный тироксин незначительно связывается с ядром, а цитоплазматический комплекс тироксина цельного супернатанта и I пика в четыре раза увеличивает связывание тироксина. II и III фракции цитоплазмы не способствуют свя-

зыванию гормона с ядерными структурами. Наши данные полностью соответствуют представлению о том, что цитоплазматические рецепторы играют важную роль в акцептировании гормонов ядерными структурами.

Из интактных ядер клеток печени куриных эмбрионов по стандартной методике был получен дезоксирибонуклеопротеид (ДНП). Препараты ДНП, выделенные из ядер печени 5- и 20-дневных куриных эмбрионов, характеризовались отношением белок/ДНК при  $D_{280}/D_{260} = 0,53$ .

Опыты по связыванию различных препаратов ДНП проводили колоночным методом, как и в случае исследования тироксинсвязывающих белков  $200\ 000 \times g$  супернатанта цитоплазмы, а также пробирочным методом, как в случае исследования тироксинсвязывающей способности ядер. В результате выявлено, что ДНП 5- и 20-дневных эмбрионов обладают выраженной тироксинсвязывающей способностью. Связывание гормона увеличивается по мере обеднения хроматина гистоновыми белками методом Г. П. Георгиева и др. (1970):

Препарат	Радиоактивность эмбрионов, имп/мин/мг ДНК*	
	5-дневных	20-дневных
Исходный ДНП	2160	1920
ДНП <sub>0,7</sub>	5400	4800
ДНП <sub>2,0</sub>	13800	11400

Связывание свободного  $J^{125}$ -тироксина с исходным ДНП указывает, что в структуре ДНП имеются гормонсвязывающие участки. При экстракции ДНП 0,25 н. HCl совместно с гистонами освобождается 24% меченого тироксина, а на долю с кислыми и остаточными белками приходится 76% гормональной метки, связанной с интактным ДНП.

При постепенном обеднении ДНП гистоновыми белками в вариантах с различными концентрациями NaCl сильно увеличивается тироксинсвязывающая активность хроматина. По литературным данным, при обработке ДНП 2 М NaCl из структуры удаляются все гистоны (Георгиев и др., 1970), а также ряд кислых белков, прежде всего ядерных рецепторных белков для эстрогенов (Jensen, De Sombre, 1972). Следовательно, усиленное связывание меченого тироксина с ДНП<sub>0,7</sub> и ДНП<sub>2,0</sub> является результатом раскрытия акцепторных участков в структуре хроматина. Поскольку остающийся материал (ДНП<sub>2,0</sub>) состоит из комплекса ДНК с кислыми и остаточными белками, очевидно, одно из этих веществ должно являться истинным акцептором тиреоидных гормонов.

P. Thomopoulos et al. (1974) показали, что негистоновые белки ядер, выделенные по методу M. Kamajata et al. (1972), обладают специфической трийодтиронинсвязывающей активностью. Процесс связывания трийодтиронина с кислыми белками *in vitro* протекает моментально, фракция выходит на плато через 5 мин. при совместной инкубации при 4°C. Применение анализа по G. Scat-



чагд выявило, что в суммарной фракции негистоновых белков имеется два типа связывания гормона: с высоким сродством и малой емкостью ( $K_{дис} = 1,6 \cdot 10^{-9} M$ ); низким сродством и большой емкостью, константа диссоциации которого составила около  $10 \text{ нМ}$  трийодтиронина, что соответствует тироксинсвязывающей способности  $100\,000 \times g$  цитоплазмы клеток задней доли гипофиза, описанных S. B. Sufi et al. (1973). Максимум связывающей способности негистоновых белков отмечен на  $100 \text{ мкг}/10^{-13} M$  трийодтиронина (около 6000 молекул гормона на ядро). Относительная связывающая способность негистоновых белков для различных форм тироксина показана ниже:

$L = 3, 5, 3$ -трийодтиронин	100% $\pm 4$
$L = 3, 5, 3$ -трийодтироуксусная кислота	102% $\pm 3$
$L$ -тироксин	60% $\pm 3$
$L$ -3, 5-дийодтирозин	40% $\pm 4$
$L$ -дийодтирозин	0%
$L$ -монойодтирозин	0%

Из приведенных данных видно, что для связывания тиреоидных гормонов с рецепторами негистоновых белков необходима тирониновая структура. В то же время, сульфгидрильные группы молекулы рецепторных белков являются определяющими в связывании тирониновых структур, поскольку предварительная обработка  $2 \cdot 10^{-3} M$  меркаптоэтанолом приводит к потере гормонсвязывающей способности негистоновых белков.

C. Cochet, E. M. Chambaz (1974) также показали, что обработка  $\beta$ -меркаптоэтанолом приводит к потере цитоплазматическими рецепторами печени куриных эмбрионов кортизолсвязывающей способности. Эти данные наводят на мысль, что в связывании гормонов различными рецепторами важную роль играют сульфгидрильные группы рецепторной молекулы. Вероятно, неспецифическое связывание гормонов обусловлено наличием сульфгидрильных групп в молекуле всех рецепторов, а специфичность определяется пространственной структурой самих гормонов.

Нами была изучена тироксинсвязывающая способность очищенных препаратов ДНК, выделенной из семенников петухов. Нативную ДНК разрушали ультразвуковым диспергатором УЗДН-1 в режиме 35 кГц, 0,3 ма по 3 мин., импульсами по 20 сек. при  $20^\circ C$ . Диспергирование в указанном режиме разрывает цепь ДНК на кусочки длиной 250—500 нуклеотидных последовательностей. Озвученную в  $0,1 M$  стандартном солевом растворе ДНК денатурировали при  $100^\circ C$ , резко охлаждали и выжигали по методу R. J. Britten (1968) до определенных значений  $C_{0t}$  и разделяли на колонке с гидроксипатитом, нагретым до  $62,5^\circ C$   $0,12 M$  и  $0,3 M$  Na-фосфатным буфером соответственно для элюции одноцепочечных и ренатурировавших двуцепочечных фрагментов ДНК.

Связывание препаратов ДНК с  $J^{131}$ -тироксинам

Препарат ДНК	Радиоактивность, имп/мин/мг ДНК
Нативная, двуцепочечная	5500
Денатурированная, одноцепочечная	0 (300 имп на выходе без ДНК)
Высокоповторяющиеся последовательности ( $C_0t=0-500$ )	9400
Редкоповторяющиеся последовательности ( $C_0t = 500$ и более)	1100

Связывание меченого тироксина с различными фракциями ДНК изучали на колонке, наполненной сефадексом Г-50 (тонкой), уравновешенной 0,01 М фосфатным буфером рН 7,4, который содержит  $10^{-6}$  М  $J^{131}$ -тироксина. Уравновешивание колонки достигалось выравниванием количества имп/мл на входе и выходе колонки.

Таким образом, для связывания гормона необходима нативная двуспиральная структура ДНК, а также высокоповторяющиеся последовательности, которые, согласно R. J. Britten (1968), состоят преимущественно из Г+Ц нуклеотидов.

В литературе описаны единичные исследования по взаимодействию стероидных гормонов с нативной двуцепочечной ДНК. Н. Dappenberg (1963) считает, что проекция плоской поверхности стероидных гормонов очень сходна с таковой пар оснований в спирали ДНК, что, возможно, облегчает их взаимодействие. Однако, по данным М. Feigelson, Р. Feigelson (1965), гидрокортизон и кортикостерон *in vitro* не взаимодействуют с очищенной двуцепочечной ДНК крыс. В то же время стероид прегнен-3,20-диамин в значительной мере связывается с ДНК, вызывая изменение оптических свойств последней (Mochleg et al., 1968).

Существуют сведения о связывании растительного гормона гиббереллиновой кислоты, пространственная структура которой близка стероидной структуре, с А-Т-богатыми последовательностями ДНК (Kessler, 1969, 1971). Согласно В. Kessler, гиббереллиновая кислота связывается с одноцепочечными разрывами А-Т-дуплекса и определяет место действия ДНК-лигазы, в результате чего на длинной молекуле ДНК образуются кольцевые участки А-Т-последовательностей, сшитые ДНК-лигазой. Эти кольцевые участки по размерам соответствуют отдельно реплицируемым фрагментам (Okazaki et al., 1968) и являются элементарной единицей транскрипции, описанной М. Hayashi et al. (1964).

К сожалению, наблюдаемое нами взаимодействие тиреоидных гормонов с двуцепочечной ДНК рассмотреть с этой позиции пока не представляется возможным.

Краткий анализ литературы, а также наши экспериментальные данные по механизму действия тиреоидных гормонов показывают, что эти гормоны в цитоплазме тканей-мишеней имеют свои специфические рецепторные белки, участвующие в связывании гор-



мона ядерными структурами. В ядрах тироксин связывается преимущественно кислыми белками хроматина и может связываться *in vitro* с высокоповторяющимися последовательностями ДНК.

По аналогии с генотропным действием различных классов стероидных гормонов можно предположить, что акцептирование тиреоидных гормонов различными хроматиновыми структурами является основным механизмом генотропного действия этих гормонов.

Доказательством прямого генотропного действия гормонов вообще и тиреоидных гормонов в частности является обнаружение их фиксации непосредственно на генетическом материале в опытах *in vivo*. Тот факт, что меченые тиреоидные гормоны, введенные в организм, быстро обнаруживаются в цитоплазме и нуклеоплазме, более того, специфически связываются экстрагируемыми из ядер негистоновыми белками (Oppenheimer et al., 1972, 1973; Surks et al., 1973; Samuels, Tsai, 1973, 1973a, 1974; Thomopoulos, 1974), показывает, что эти гормоны для проявления непосредственного генотропного эффекта должны акцептироваться определенными структурами интерфазного хроматина. Если это предположение верно, то при вступлении клетки в митоз, т. е. при конденсации хроматина связанный им гормон должен обнаруживаться в структуре хромосом. Это предположение проверялось нами в серии экспериментов по локализации меченых тиреоидных гормонов в культивируемых клетках фибробластов 8—10-недельных эмбрионов человека.

В культуру клеток фибробластов на максимальной фазе роста вводили по 10 мккюри  $J^{125}$ -L-трийодтиронина на 1 мл среды роста с таким расчетом, чтобы конечная концентрация гормона составляла  $10^{-7}$  М. Через 60 мин. инкубации при  $37^{\circ}\text{C}$  среду роста сливали, ополаскивали свежей порцией и заливали средой роста, содержащей 2 мкг/мл винбластина в первоначальном объеме. Через 3 час. инкубации при  $37^{\circ}\text{C}$  сливали среду, снимали прикрепленные клетки со стенок посуды ЭДТА-трипсином (1:1), подвергали гипотоническому шоку в течение 7 мин. в 0,075 М КСI и фиксировали смесью ледяная уксусная кислота — абсолютный метиловый спирт (3:1). Фиксированные препараты покрывали эмульсией «М» и экспонировали 9 суток при  $4^{\circ}\text{C}$ . Проявленные и закрепленные препараты окрашивали и фотографировали (рис. 18).

Как видно из представленных рисунков, меченый  $J^{125}$ -трийодтиронин локализуется в нуклеоплазме и на различных участках метафазных хромосом. В то же время нет определенной закономерности в связывании гормона. На метафазных пластинках гормоны локализуются на различных участках хромосом. По-видимому, это объясняется тем, что в момент введения гормона клетки находятся в разных фазах митотического цикла. В тех же условиях ни  $J^{125}$  ДИТ, ни неорганический  $J^{125}$  не связываются с ядерными структурами и метафазными хромосомами, что указывает на необ-



ходимость тирониновой структуры для связывания гормона с акцепторными участками хромосомы и нуклеосола.

Наши экспериментальные данные, а также описанные в литературе, доказывают, что тиреоидные гормоны участвуют в регуляции генетической активности на очень ранних стадиях развития головастиков (Tata, 1968), куриных эмбрионов и, возможно, культивируемых фибробластов 8—10-недельных эмбрионов человека. Гормонкомпетентные эмбриональные клетки имеют набор специфических рецепторов в цитоплазме, нуклеоплазме и в структурах хрома-



Рис. 18. Локализация  $J^{125}$ -трийодтиронина на метафазных хромосомах и в интерфазном ядре. Ув. 2000.

тина задолго до становления функции собственной щитовидной железы. Выработанные щитовидной железой гормоны, проникая через клеточную мембрану, образуют специфические гормон-белковые комплексы в цитоплазме. Они связываются с цитоплазматическими белками двоякого рода связывающими участками: 1) с высоким сродством и малой емкостью, 2) с низким сродством, но большой емкостью (Sufi et al., 1973; Туракулов и др., 1974).

Согласно Е. Е. Baulieu (1971), биологический смысл специфического связывания гормональных лигандов со специфическими рецепторами с высоким сродством и малой емкостью заключается в обеспечении фиксации гормонов при их низкой физиологической концентрации и в ограничении этого процесса при патологическом повышении концентрации гормонов. Второй тип связывания — с низкой константой сродства, но большой емкостью — может служить своеобразной буферной системой, способной аккумулировать гормон в широких пределах концентрации. По-видимому, цитоплазматические рецепторы состоят из двоякого рода белков, обладающих различной специфичностью связывания, а не содержат в



своей структуре два участка с различным сродством к одному и тому же гормону. Это предположение подтверждается тем, что очищенные рецепторы глюкокортикоидов имеют один тип связывания — с высоким сродством и низкой емкостью (Beato et al., 1960; Baulieu, 1971; Tomkins, 1972; Higgins, 1973), а  $150\,000 \times g$  супернатант цельной цитоплазмы печени цыплят обладает двумя типами связывающих участков (Cohet, Chambas, 1974).

Тиреоидные гормоны при инкубации с очищенными ядрами связываются незначительно, но инкубация ядер с гормонсвязывающей цитоплазмой или гормон-рецепторным комплексом многократно усиливает связывание гормона ядерными структурами. В ядрах гормоны связываются с глобулярными белками нуклеоплазмы, негистоновыми белками, экстрагируемыми 0,4 М КСl, хроматином и с двуцепочечной ДНК (наши данные и Surks et al., 1973; Samuels, Tsai, 1973, 1973a, 1974; Thomopoulos et al., 1971). Три-йодтиронин специфически связывается с различными участками хромосом при добавлении его в среду роста культуры клеток фибробластов 8—10-недельных эмбрионов человека.

Как мы уже рассмотрели ранее, выражением регуляции генетической активности тиреоидными гормонами является индукция синтеза разнообразных ферментов и других белков, усиление синтеза рибосомальной РНК и гетерогенной ядерной РНК, перестройка белоксинтезирующего аппарата, образование полисом из монорибосом, а также индукция новых популяций ядерной РНК, подтверждаемая экспериментами по конкурентной гибридизации и гибридизации ДНК-РНК в насыщающем избытке последней, где было обнаружено активирование около 4% генома, участвующего в синтезе гетерогенной ядерной РНК. По-видимому, тиреоидные гормоны регулируют генетическую активность клеток так же, как в случае с разнообразными стероидными гормонами, т. е. посредством влияния ядерного гормонбелкового комплекса на структурное состояние хроматина и увеличения РНК-полимеразной активности. Это подтверждается данными наших исследований, выявивших изменение функционального состояния хроматина при выключении функции щитовидной железы введением 6-метилтиоурацила и при введении физиологических концентраций ( $10^{-7}$  М) L-тироксина, а также заметное усиление РНК-полимеразной активности при инкубации очищенных ядер печени, выделенных из интактных эмбрионов в присутствии гормонсвязывающей цитоплазмы.

Большой интерес представляет тот факт, что выключение функции щитовидной железы приводит к заметному изменению спектра кислых белков хроматина тканей печени и мозга куриных эмбрионов. Эти изменения тироксинзависимы, поскольку введение гормона на фоне действия 6-метилтиоурацила или тиомочевины нормализует спектры белков хроматина. Очевидно, синтез определенных молекул кислых белков индуцируется тироксином в клетках печени и мозга куриных эмбрионов.



С. S. Teng, T. H. Hamilton (1968, 1970) на примере 17 $\beta$ -эстрадиола в матке крыс и E. M. Wilson, T. C. Spelsberg (1973) на примере диэтилстилбестрола в яйцеводе цыплят выявили фракцию кислых белков, индуцируемых этими гормонами. Вероятно, гормональная индукция активности генов, ответственных за синтез тех или иных фракций кислых белков хроматина, широко распространена.

Ценность исследований гормональной регуляции синтеза кислых белков хроматина выражается в том, что эти белки из-за большого разнообразия являются более вероятными, по сравнению с гистонами, кандидатами, участвующими при включении и выключении генетической активности. В пользу такого предположения говорят следующие экспериментальные данные: глюкокортикоидами и эстрогенами индуцированные фракции кислых белков направляют синтез специфических РНК в тканях-мишенях (Shelton, Allfrey, 1970; Teng, Hamilton, 1970).

Ряд исследователей указывают на специфическое усиление транскрипции хроматина *in vitro* различными фракциями кислых белков (Paul, Gilmour, 1968, 1969; Wang, 1971; Камаяма, Wang, 1971; Spelsberg et al., 1971; Stein et al., 1972; Камаяма et al., 1972; Kostraba, Wang, 1972; Shea, Kleinsmith et al., 1973). Определенные фракции кислых белков хроматина являются ядерными акцепторами различных стероидных гормонов. Например, ядерный гормон-рецепторный комплекс эстрадиола связывается только одной фракцией кислых белков хроматина яйцевода цыплят, обозначенной как АРЗ-фракция (Spelsberg et al., 1972). Исследования показали, что в составе кислых белков хромосом имеются ферменты, участвующие в регуляции генетической активности, такие как ацетилтрансфераза гистонов, диацетилаза, киназа, метилаза, РНК-полимераза, ДНК-полимераза и другие (Wang, 1967; Howk, Wang, 1969; Камаяма et al., 1972; Vidali et al., 1972).

Установлено, что кислые белки хроматина последовательно специфически связываются с ДНК. Это было однозначно показано реконструкцией хроматина отжиганием ДНК с кислыми белками (Teng et al., 1971) методом ДНК-целлюлозной колоночной хроматографии (Kleinsmith, 1973; Van den Broek et al., 1973) и методом ультрафильтрации смесей ДНК и кислых белков мембранными фильтрами В-6 (Riggs et al., 1970; Sheehan, Olins, 1974). Связывание выделенных из ядер 0,4 М КСl эстрадиол-рецепторных комплексов с ДНК также находится в соответствии с этими данными (Clemens, Kleinsmith, 1972; Yamamoto, Alberts, 1972; Musliner, Schader, 1972).

Сложность координации работы генов, «каскадный» характер их включения и выключения (Уоддингтон, 1964) указывают, что регуляторные компоненты генов эукариотов намного сложнее, чем у бактерий и вирусов.

Исследования скорости реассоциации денатурированной ДНК (Britten, 1968) и кинетики гибридизации ядерной высокополимер-



ной РНК с ДНК (Георгиев, 1968) показали, что геном эукариотов содержит большое количество повторяющихся нуклеотидных последовательностей, которые участвуют в транскрипции гигантской молекулы ядерной РНК.

На основе этих данных и соответствующих литературных сведений Г. П. Георгиев выдвинул гипотезу о структурной организации генома эукариотов, суть которой сводится к следующему: оперон начинается с промотора, на котором РНК-полимераза инициирует синтез РНК; за промотором следует большое количество акцепторных участков, к ним прикрепляются различные белки-регуляторы, которые могут репрессировать или дерепрессировать активность оперона. При определенном сочетании внутриклеточных процессов может произойти считывание оперона РНК-полимеразой.

Опероны имеют как одинаковые, так и различные акцепторные последовательности и поэтому зависят как от одинаковых, так и от различных белков регуляторов. При считывании оперона образуется гигантская молекула ядерной РНК, проксимальная часть (5'-конец) которой является копией с регуляторной зоны, а дистальная часть (3'-конец) — со структурных генов. Копия с регуляторных последовательностей ДНК не нужна для кодирования белков и поэтому избирательно разрушается еще в ядре, подвергаясь так называемому «процессингу», а копия со структурных последовательностей ДНК является собственно информационной РНК. После «процессинга» она в виде информофера выходит из ядра в цитоплазму, где обнаруживается в составе полисом или информосом (Spigín, 1969; Айтхожин, Белицина, 1964; Овчинников, Спирин, 1971) как запасная форма иРНК.

В настоящее время гипотеза Г. П. Георгиева считается наиболее обоснованной, поскольку она подкреплена необходимыми экспериментальными доказательствами. Так, показано, что в проксимальной (5') части гигантских молекул ДНК-подобной РНК локализовано большинство участков, являющихся копиями с многократно повторяющихся нуклеотидных последовательностей ДНК, что доказывается кинетикой гибридизации этой РНК с ДНК. Установлено также, что именно эта часть ядерной РНК подвергается внутриядерному «процессингу», т. е. распадается до выхода из ядра, а истинная иРНК, переходящая в цитоплазму, составляет дистальную часть молекул ядерной РНК. Тот факт, что иРНК является дистальной частью гигантской ядерной РНК, подтверждается конкуренцией иРНК цитоплазмы с дистальными (3') последовательностями гигантской ядерной РНК в экспериментах по конкурентной гибридизации (Мантьева, Арион, 1969; Мантьева и др., 1971; Кутель и др., 1971; Рысков и др., 1972).

Таким образом, геном эукариотов отличается от генома бактерий большой сложностью регуляторной зоны, на что указывают также расчеты G. Lefevre (1971).

Содержание ДНК в отдельных дисках хромосом колеблется от  $5 \cdot 10^3$  до  $2,5 \cdot 10^5$  пар нуклеотидов. Из генетических исследований известно, что каждому гену соответствует только один диск (Гвоздев и др., 1972; Kaufman et al., 1969).

Белок среднего размера с молекулярным весом 50 000 кодируется 1500 нуклеотидными последовательностями. Если взять за среднее  $3 \cdot 10^4$  нуклеотидов на диск, следовательно, на 1 ген, то такое количество ДНК способно кодировать в среднем 20 полипептидных цепей с мол. весом 50 000 каждая. Это означает, что регуляторные участки оперонов в 20 раз больше, чем структурные участки, синтезирующие истинную иРНК. Известно (Хесин, 1972), что операторы у бактерий содержат примерно 30—50 пар нуклеотидных последовательностей, достаточных для присоединения молекулы белка регулятора. В этом случае каждый диск — хромомер, соответствующий одному гену, может прикреплять до 1000 молекул белка регулятора.

Такого рода данные позволили Ф. Сгик (1971) предположить, что вся хромонема построена из одной гигантской молекулы ДНК. Ее части, находящиеся в дисках, составляют контролирующие компоненты генов, а участки ДНК в междисковых пространствах непосредственно кодируют белки, т. е. являются собственно структурными генами. В дисках ДНК расположена в виде глобулы, образовавшейся в результате специфического сверхзакручивания. Регуляторные белки способны сверхзакручивать структуру ДНК. Сверхзакручивание части ДНК в дисках регуляторными белками может вызвать в прилегающих участках частичное расплетение. Это может обеспечить присоединение других белков регуляторов или РНК-полимеразы к ДНК путем «узнавания» ими последовательностей нуклеотидов в ДНК. Это положение гипотезы получило недавно убедительное подтверждение в исследованиях К. Р. Сох et al. (1973), показавших раскрытие дополнительных участков в структуре хроматина матки, способных специфически связывать РНК-полимеразу II после введения эстрогена, поскольку известно, что рецепторы эстрадиола связываются с последовательностями ДНК (Clemes, Kleinsmith, 1972; Yamamoto, Alberts, 1972; Toft, 1972; Musliner, Schader, 1972; King, Gordon, 1972). С другой стороны, при образовании суперспиральных глобулярных клубков ДНК количество нуклеотидных последовательностей для акцептирования различного рода регуляторных белков многократно уменьшится.

Механизм действия тиреоидных и разнообразных стероидных гормонов на генетическую активность клеток показан на рис. 19.

Ген-регулятор кодирует синтез белка-активатора, который в определенных случаях может выполнять рецепторную функцию для одного из упомянутых гормонов. В результате специфического взаимодействия гормона с рецептором в структуре последнего происходит конформационный сдвиг. Рецептор из «ожидательной» структуры превращается в «необходимую» и способен узнавать



поверхность акцепторного участка оператора индуцибельного оперона.

Вследствие специфического взаимодействия гормон-рецепторного комплекса с акцептором создаются благоприятные условия

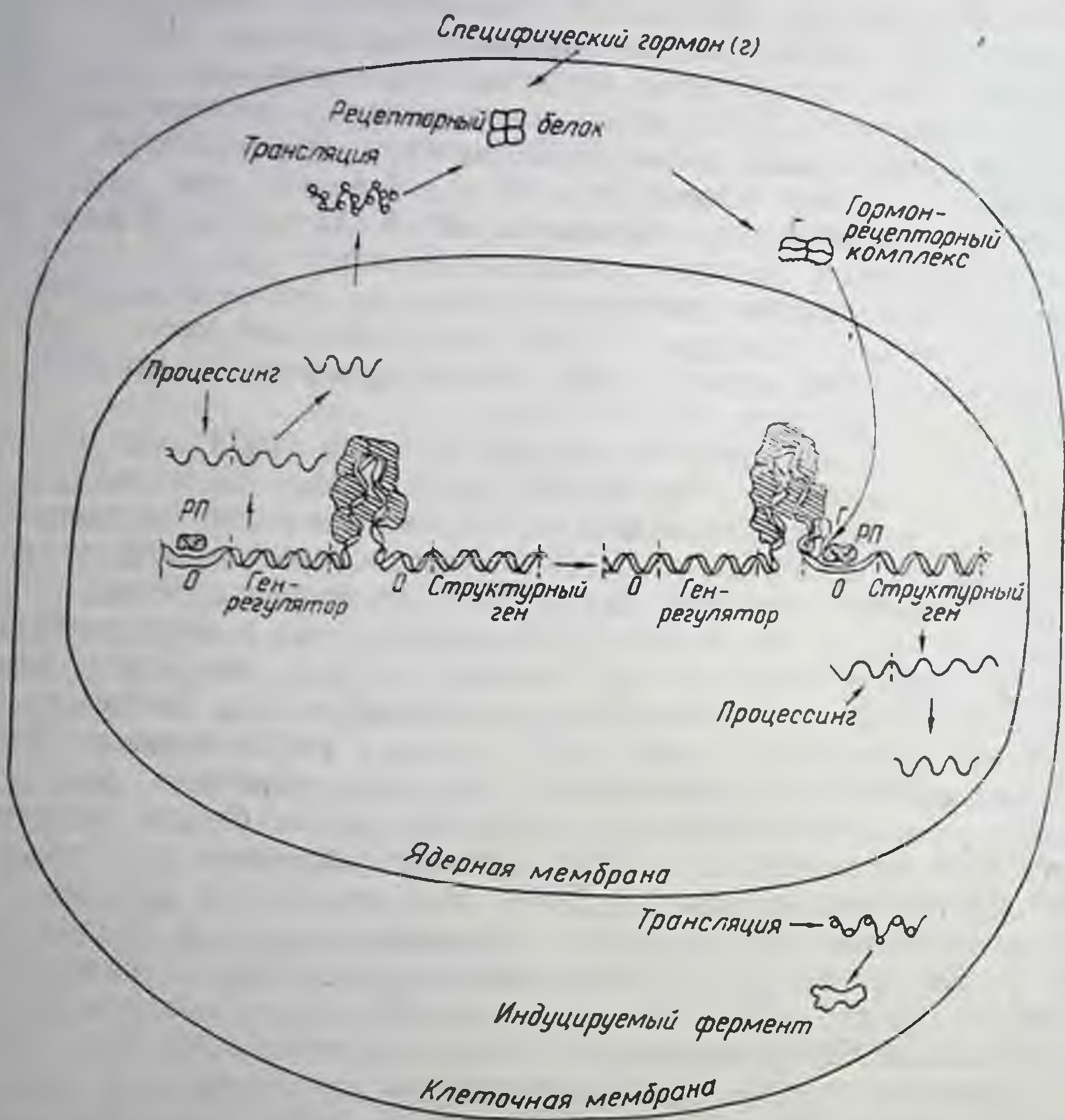


Рис. 19. Схема регуляции генетической активности тиреоидными и стероидными гормонами. О—оператор, РП—РНК-полимераза.

для посадки РНК-полимеразы на определенные последовательности оператора, что приводит к считыванию оперона. В результате процессинга неинформативная часть гигантской яРНК расщепляется, и РНК, транслируясь, синтезирует индуцируемый фермент.

В определенных условиях один и тот же рецептор может узнавать операторную часть нескольких индуцибельных оперонов. Об этом свидетельствуют данные по локализации триодтиронина на хромосомах (Абдукаримов и др., 1975). По-видимому, механизм усиления синтеза всех классов РНК под действием гормонов осуществляется также по приведенной схеме (рис. 19).

## ЛИТЕРАТУРА

- Арион Б. Я., Георгиев Г. П. ДАН СССР, 1972, т. 172, стр. 716.
- Айтхожин М. А., Белицина Н. В., Спирин А. С. «Биохимия», 1964, т. 29, стр. 169.
- Абдукаримов А. [и др.]. Структура и функция клеточного ядра. Новосибирск, 1975, стр. 88.
- Абдукаримов А. [и др.]. ДАН УзССР, 1975, № 4.
- Абдукаримов А. [и др.]. ДАН УзССР, 1975, № 5.
- Борисова О. Ф., Минят Э. Я. «Молекулярная биология», 1969, т. 3, № 5.
- Войткевич А. А., Нестайко Г. В. «Онтогенез» т. 2, 1971, № 1, стр. 14—25.
- Винокурова Т. И. [и др.] Рефераты научн. сообщений III Всесоюзн. биохимич. съезда, т. 2, Рига, 1974.
- Гагельганс А. И. [и др.] Тиреоидные гормоны, Ташкент, Изд-во «Фан», 1972.
- Гвоздев В. А. [и др.] II съезд Всесоюзн. общества генетиков и селекционеров им. Н. И. Вавилова, М., «Наука», 1972, стр. 101.
- Георгиев Г. П. В кн. «Химия и биохимия нуклеиновых кислот». Л., «Медицина», 1968.
- Георгиев Г. П. «Молекулярная биология», 1970, т. 4, стр. 17.
- Георгиев Г. П. [и др.]. «Молекулярная биология», 1970, т. 4, стр. 246—251.
- Кутель Ч., Рысков А. П., Георгиев Г. П. Молекулярная биология, 1971, т. 5, стр. 334.
- Константинова И. М., Воробьев В. М. «Цитология», 1970, т. 12, стр. 1530.
- Киселев А. Л. [и др.] Молекулярные основы биосинтеза белков. М., «Наука», 1971.
- Лавриненко И. А. «Молекулярная биология», 1969, т. 3, № 3.
- Морозова Т. М., Салганик Р. И. «Молекулярная биология», 1969, т. 3, № 5, стр. 745—748.
- Мицкевич М. С. Железы внутренней секреции в зародышевом развитии птиц и млекопитающих. Москва, Изд-во АН СССР, 1957.
- Мантьева В. Л., Арион В. Я. «Молекулярная биология», 1969, т. 3, стр. 294.
- Мантьева В. Л., Авакян Э. Р., Георгиев Г. П. «Молекулярная биология», 1971, т. 5, стр. 321.
- Нейфах А. А. Генетические основы развития. М., «Знание», 1969.
- Овчинников Л. П., Спирин А. С. «Успехи современной биологии», 1971, т. 71, № 3.
- Покровский Г. В., Юдаев Н. А. II Всесоюзный биохимич. съезд. Тезисы секционных сообщений, Ташкент, 1969, стр. 22.
- Рысков А. П., Рарашьян В. Р., Георгиев Г. П. «Молекулярная биология», 1972, т. 6, стр. 300.
- Самарина О. П., Асриян И. С., Георгиев Г. П. ДАН СССР, 1965, т. 63, стр. 1510.



- Самарина О. П., Лукашдин Е. М., Георгиев Г. П., «Молекулярная биология», 1968, т. 2, стр. 79.
- Туракулов Я. Х. Вестник АМН СССР, 1969, т. 8, стр. 28—40.
- Туракулов Я. Х., Ташмухамедов Б. А., Гагельганс А. И. «Митохондрии. Биохимические функции в системе клеточных оргanelл», М., «Наука», 1969, стр. 111.
- Туракулов Я. Х., Мирахмедов М. М. Бюл. эксперим. биол. и мед., 1972, № 12.
- Туракулов Я. Х. [и др.] ДАН СССР, 1974, т. 228, вып. 1, стр. 238.
- Туракулов Я. Х. [и др.]. В кн. «Митохондрии. Ферментативные процессы и их регуляция», М., «Наука», 1969, стр. 89.
- Уоддингтон К. Морфогенез и генетика, М., «Мир», 1964.
- Хесни Р. Б. В сб. «Клеточная дифференцировка и индукционные механизмы», М., «Наука», 1965, стр. 87.
- Хесни Р. Б. «Успехи современной биологии», 1972, т. 74, вып. 2 (5), стр. 171—193.
- Хамидов Д. Х. [и др.]. Материалы Всесоюзн. съезда эндокринологов, Москва, 1972.
- Хамидов Д. Х. [и др.]. Мед журнал Узбекистана, 1974, № 4.
- Хамидов Д. Х., Адылова А. Т., Абдукаримов А. Рефер. науч. сообщений III. Биохимич. съезда, т. I, Рига, 1974.
- Юдаев Н. А., Покровский Б. В. «Биохимия», 1970, т. 35, стр. 72.
- Юдаев Н. А., Покровский Б. В. «Биохимия», 1971, т. 36, стр. 380.
- Юдаев Н. А., Протасова Т. Н. «Успехи современной биологии», 1971, т. 72, вып. 1(4), стр. 118—138.
- Юдаев Н. А., Покровский Б. В. «Биохимия», 1973, т. 38, стр. 1089.
- Юдаев Н. А., Покровский Б. В. «Биохимия», 1974, т. 39, стр. 683.
- Allfrey W. G., J. Biol. Chem., 1972, 247, p. 7365.
- Allfrey W. G., Mirsky A. E. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 1962, 48, p. 1590.
- Amara L. [et al.]. Biochem. Biophys. Acta, 1974, 362, p. 332—345.
- Anderson K. M., Liao S. Nature, 1971, 219, p. 227.
- Anderson W. B. [et al.]. J. Biol. Chem. 1971, 246, p. 5929.
- Arnaud M. [et al.]. Biochem. Biophys. Acta, 1971, 232, p. 117.
- Ashburner M. Nature, 1970, 227, p. 187.
- Barker K., Warren J. Endocrinology, 1967, 80, p. 536.
- Barnabei O., Ottolenghi C. Advances. Enzyme. Regul., 1968, 6, p. 185.
- Barnabei O. [et al.] J. Cell. Biol., 1969, 43, p. 432.
- Baulieu E. E. [et al.]. Recent Progress in Hormon Research. New York—London, 1971, 27, p. 351—419.
- Baxter J. D., Tomkins G. M. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 1970, 65, p. 709.
- Baxter J. D. [et al.]. Science, 1971, 171, p. 189—191.
- Baxter J. D., Gordon M., Tomkins G. T., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 1971, 68, № 5, p. 932—937.
- Beato M. [et al.]. Steroids, 1970, 16, p. 207.
- Beato M., Katimi M., Feigelson P. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1972, 46, p. 1464—1472.
- Beato M., Feigelson P. J. Biol. Chem., 1972, 247, p. 7890—7896.
- Beato M., Schmid W., Sekeris C. E. Biochem. Biophys. Acta, 1972, 263, p. 764—774.
- Beerman W. Chromosoma, 1952, 5, p. 139—198.
- Berendes H. D. Chromosoma, 1967, 22, p. 274.
- Berendes H. D. Symp. Soc. Exptl. Biol., 1971, 25, p. 145.
- Bertrand H. A. [et al.]. Biochem. J., 1971, 10, № 20, p. 3679.
- Best-Belpomme M., Tries J., Erdos T. European J. Biochem., 1970, 17, p. 245.
- Beziat Y., Guilleux J. C., Mousseron-Canet M. Compt. Rend., 1970, D270, p. 1620.
- Bhorjee G. S., Pederson T. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 1972, 69, p. 3345.
- Blattiu S. P. [et al.] Cold spring. Harbor Sympos. Quant. Biol., 1970, 35, p. 649—657.

- Blattler D. P., Reithel J. *Chromatogr.*, 1970, 16, p. 286.
- Bradley D. F., Wolf M. K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 1959, 45, p. 994.
- Brecher P. U. [et al.] *Federation Proc.*, 1970, 29, p. 249.
- Brenner M. E., Pavan C. *Chromosoma*, 1955, 7, p. 371—386.
- Britten R. J., Kohne D. E. *Science*, 1968, 161, p. 529.
- Britten R. J., Davidson E. H. *Science*, 1969, 165, p. 349.
- Van den Brock H. W. J. [et al.] *Biochemistry*, 1973, 12, p. 229.
- Bruchovsky N., Wilson J. D. *J. Biol. Chem.*, 1968, 243, p. 5953.
- Böttger I., Kriegel H., Wieland O. *Europ. J. Biochem.*, 1970, 13, p. 253.
- Carter W. G., Faas F. H., Wynn J. J. *J. Biol. Chem.*, 1971, 241, p. 4973—4977.
- Chan L. M., Means A., O'Malley B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 1973, 70, N 6, p. 1870—1874.
- Chatkoff M. L. [et al.] *Biochem. Biophys. Acta*, 1974, 343, p. 480—491.
- Chitill F., O'Malley B. W. *J. Biol. Chem.*, 1972, 247, p. 1368.
- Church R. B., McCarthy B. J. *Biochem. Biophys. Acta*, 1970, 199, p. 103.
- Clemens L. E., Kleinsmith L. *Nature New Biol.*, 1972, 237, N 76, p. 204—206.
- Clever U. *Chromosoma*, 1961, 12, p. 607—675.
- Clever U. *Science*, 1964, 146, p. 794.
- Clever U. *Ann. Rev. Genet.*, 1968, 2, p. 11.
- Clever U., Storberck J., Romball C. G. *Exptl. Cell. Res.*, 1969, 55, p. 306.
- Cochet C., Chambaz E. M. *Biochem. Biophys. Acta*, 1974, 362, p. 37.
- Cohen J., Felman R. E., Whitbeck A. A. *Am. J. Physiol.*, 1969, 216, p. 76.
- Cohen P. *Science* 1970, 168, p. 533.
- Commerford S. L. *Biochemistry*, 1971, 10, p. 1993.
- Cox R. P., McLeod C. M. *Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol.*, 1964, 29, p. 233.
- Cox R. P., Hainess M. E., Carey N. H. *Europ. J. Biochem.*, 1973, 32, p. 513—524.
- Crick F. *Nature*, 1971, 234, p. 25.
- Crombrugghe B., [et al.] *Nature New Biol.*, 1971, 231, p. 139.
- Dannenbergh H. *Deutsch. med. Wochenshr.*, 1963, 88, p. 605.
- Dahmus M. E., Bonner J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 1965, 54, p. 1370.
- Davis R. J., Spaulding S. W., Gregerman P. J. *Chromatogr.*, 1970, 16, p. 286.
- Delsol M., Fratin J., Bottu V. *Ann. histochem.*, 1966, 11, p. 183.
- Du Toit C. H. In: «A symposium on phosphorus metabolism». Johns Hopkins Press, Baltimore, 1952, 2, p. 597.
- Earp H. C. *Biochem. Biophys. Acta*, 1974, 340, p. 95—105.
- Emmer M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 1970, 66, p. 480.
- Emmerich H. *Exptl. Cell. Res.*, 1969, 58, p. 261.
- Emmerich H. *Insect. Physiol.*, 1970, 16, p. 725.
- Emmerich H. *Vergleich. Physiol.*, 1970a, 68, p. 385.
- Erdos J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1968, 32, p. 338.
- Eron L. [et al.] *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 1971, 68, p. 215.
- Fang S., Anderson K. M., Liao S. J. *J. Biol. Chem.*, 1969, 244, p. 6584.
- Fang S., Liao S. *Mol. Pharmacol.*, 1969, 5, p. 428.
- Fang S., Liao S. *J. Biol. Chem.*, 1971, 246, N 1, p. 16—24.
- Feigelson M., Feigelson P. *Advances Enzyme Regul.*, 1965, 3, p. 11.
- Filler R., Morey K. S., Litwack G. In: «Biochemical Actions of Hormones», v. II (ed. by G. Litwack), New York—London, 1972.
- Flickinger R. A., Roche F. M. *Biochem J.* 1972, 130, p. 319.
- Garren L. D., Howell R. R., Tomkins G. M. *J. Mol. Biol.*, 1964, 9, p. 100.
- Garren L. D. [et al.] *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 1964, 52, p. 1121.
- Gehring U., Tomkins G., Ohno S. *Nature New Biol.*, 1971, 232, p. 106.
- Gelehrter T. D., Tomkins G. M. *J. Mol. Biol.*, 1967, 29, p. 59.
- Georgiev G. P. *J. Teoret. Biol.*, 1969, 25, p. 477.
- Gillespie D., Spiegelman S. *J. Mol. Biol.*, 1965, 12, p. 829.
- Gilbert W., Müller-Hill B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 1966, 56, p. 1891—1897.
- Gloina R. E., Wilson J. D. *J. Clin. Endocrinology*, 1969, 29, p. 970.



- Goldstein L., Stella E. Y., Knox W. E. *J. Biol. Chem.*, 1962, 237, p. 1723.
- Goldstein L., Knox W. E. *Ann. New York Acad. Sci.*, 1963, 111, p. 233.
- Gorski J. [et al.]. *Recent Progr. Hormone Res.*, 1968, 24, p. 45.
- Granner D. K. [et al.]. *Science*, 1968, 162, p. 1018.
- Granner D. K., Thompson E. B., Tomkins G. M. *J. Biol. Chem.*, 1970, 245, p. 1472.
- Green A., Marshall J., Pensky J. *Biochem. Biophys. Acta*, 1972, 278, N 1, p. 117.
- Greenblatt J., Schleif R. *Nature New Biol.*, 1971, 232, p. 166.
- Greengard O., Gordon M. *J. Biol. Chem.*, 1963, 238, p. 3708.
- Griswold M. D., Cohen P. P. *J. Biol. Chem.*, 1972, 247, p. 353.
- Griswold M. D., Cohen P. P. *J. Biol. Chem.*, 1973, 248, p. 5854.
- Grossbach U. *Ann. Zool. Fenn.*, 1968, 5, p. 37.
- Hackney J. F. [et al.] *Mol. Pharmacol.*, 1970, 6, p. 500.
- Hager C. B., Kenney, F. T. *J. Biol. Chem.*, 1968, 243, p. 3296.
- Hamada S., Torizuka K., Miyoke T. *Gumna symp. on Endocrin.*, 1966, 3, p. 153.
- Hayashi M., Hayachi M., Spiegelman S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 1964, 51, p. 351.
- Herrmann W. L. *J. Clin. Endocrin. Metab.*, 1968, 28, p. 1824.
- Higgins S. [et al.]. *J. of Biochem.*, 1973, 248, N. 16, p. 5873—5879.
- Hoch F. L. *Physiological Reviews*, 1962, 42, N 4, p. 605.
- Hoch F. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 1967, 58, p. 506.
- Hoch F. L., Lipmann F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 1954, 40, p. 909.
- Hollander N., Chin Y. W. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1966, 35, p. 291.
- Hough D., Arnaud M., Mousseron-Cañet M. *Compt. Rend.*, 1970, D. 271, p. 603.
- Howk R., Weng T. Y. *Arch. Biochem. Biophys.* 1969, 133, p. 238.
- Huang R. C., Bonner J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 1962, 48, p. 1216.
- Ingbar S. H., Freinkel N. *Recent Progr. Horm. Res.*, 1960, 16, p. 353.
- Jacob F., Monod J. *J. Mol. Biol.*, 1961, 3, p. 318.
- Jensen E. V., Jacobson H. I. *Recent progress in Hormone Res.*, 1962, 18, p. 387.
- Jensen E. V. [et al.]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 1968, 59, p. 633—638.
- Jensen E. V. [et al.]. *Develop. Biol. Suppl.*, 1969, 3, p. 151.
- Jensen E. V. [et al.]. *Steroids*, 1969 a, 13, p. 417.
- Jensen E. V. [et al.]. *Natl. Cancer Inst. Monograph.*, 1971, 34, p. 55—70.
- Jensen E. V., De Sombre E. R. In «*Biochemical actions of Hormones*» ed. by Litwack G., v. II A. P., New York—London, 1972, p. 215—256.
- Jervell K. F. *Acta endocrinol.*, 1963, 44, p. 57.
- Jervell K., Osnes J. *Biochem. Biophys. Acta*, 1964, 91, p. 163.
- Johns E. W., Forrester S. *Eur. J. Biochem.*, 1969, 8, p. 547—551.
- Jungblut P. W. [et al.]. *Research on steroids*, 1970, 4, p. 213—232.
- Kadenbach B. *Biochem. Z.*, 1966, 344, p. 4.
- Kamaiama M., Wang T. Y. *Biochem. Biophys. Acta*, 1971, 228, p. 563.
- Kamaiama M. [et al.] *Biochem. Biophys. Acta*, 1972, 177, p. 576.
- Karlson P. In «*Mechanism of Hormone Action*», Springer-Verlag, p. 139, 1963.
- Karlson P., Schweiger A. *Z. Physiol. Chem.*, 1961, 323, p. 199.
- Karlson P., Sekeris C. E. *Biochem. Biophys. Acta*, 63, p. 489, 1962.
- Karlson P., Sekeris C. E., Maurer R. *Z. Physiol. Chem.*, 1964, 336, p. 100.
- Karlson P., Peters G. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1965, p. 5, 257.
- Kaufman T. C., Shen M. W., Judd B. H. *Genetics*, 1969, 61, p. 30.
- Keller J., Richardson U. I., Yates F. E. *Endocrinology*, 1969, 84, p. 49—62.
- Kenney F. T., Wicks W. P., Greenman D. L. *Cell. and Compar. Physiol.*, 1965, 66, N 2, p. 125.
- Kenney F. T. [et al.]. *Advances. Enzyme regulation*, 1965, 3, p. 1.
- Kessler B. *Biochem. Biophys. Acta*, 1971, 240, p. 330.
- Kessler B., Snir I. *Biochem. Biophys. Acta*, 1969, 195, p. 207.
- Kidsen C., Kirby R. *Nature*, 1964, 203, p. 599.
- King R. J. B., Cowan D. M., Inman D. R. *J. Endocrinology*, 1965, 32, p. 83.

- King R. J. B., Gordon J. Inman D. R. J. *Endocrinology*, 1965, 32, p. 9.
- King R. J. B. [et al.]. *Endocrinology*, 1966, 36, p. 139.
- King R. J. B., Gordon J., *Nat. New Biol. (London)*, 1972, 240, p. 185.
- Kleinsmith L. J. *J. of Biochem.*, 1973, 248, 16, p. 5648—5653.
- Kleinsmith L. J., Heidenuer J., Carrol L. Y. *Nature*, 1970, 226, p. 1025.
- Kleitke B., Wollenberger A. In: «V. Meet. F.E.B.S. Abstr.», Praha, p. 83, 1968.
- Klemperer H. G. *Biochem. J.*, 1955, 60, p. 122.
- Klemperer H. G. *Biochem. J.*, 1955a, 60, p. 128.
- Knox W. E., *Brit J. Exptl. Pathol.*, 1951, 32, p. 462.
- Knox W. E., Auerbach V. H. *J. Biol. Chem.*, 1955, 214, p. 307.
- Koch B. [et al.]. *Horm. Metab. Res.*, 1970, 2, p. 292—301.
- Koch J., Cruceau A. *Z. Physiol. Chem.*, 1971, 352, p. 137—142.
- Korner D., Surks M. J. *Clin. Investig.*, 52, N 62 (Abstract.), 1972.
- Kostraba N. C., Wang T. Y. *Biochem. Biophys. Acta*, 1972, 262, p. 169.
- Krause R. L., Sokoloff L. *J. Biol. Chem.*, 1967, 242, p. 1431.
- Krishna G., Hynie S., Brodie B. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 1968, 59, p. 884.
- Kroeger H. *Chromosoma*, 1964, 15, p. 36—70.
- Lang N., Sekeris C. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 1964, 339, p. 238.
- Lang N., Herrlich P., Sekeris J. C. *Acta endocrinol.*, 1968, 57, p. 33.
- Lardy H. A., Lee Y. P., Takemori A. *Proc. New York Acad. Sci.*, 1960, 85, p. 506.
- Lee N. D., Williams R. H. *Endocrinology*, 1954, 54, p. 5.
- Lee Y. P., Takemori A., Lardy H. A. *J. Biol. Chem.*, 1959, 234, p. 3051.
- Leenders H. J., Wullems G. J., Berendes H. D. *Exptl. Cell. Res.*, 1970, 63, p. 159.
- Lefevre G. *Genetics*, 1971, 67, p. 479.
- Leon H. A. *Endocrinology*, 1966, 78, p. 481.
- Lestourgeon W. M., Rush H. P. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1973, 155, p. 144.
- Levey G. S., Epstein S. E. *J. Clin. Investigation*, 1969, 48, p. 1663.
- Liao S., Liang T., Tymoczko J. L. *Nat. New Biol.*, 1973, 241, p. 211—213.
- Liarakos C. D., Rosen J. M., O'Malley B. W. *Biochemistry* 1973, 12, N 15, p. 2809—2816.
- Lieb M. J. *Mol. Biol.*, 1969, 39, p. 379.
- Lissitzky S. *Bull. Soc. Chem. Biol.*, 1960, 42, p. 1187.
- Lissitzky S., Roques M., Benevent M. T. *Biochem. Biophys. Acta*, 1960, 41, p. 257.
- Litwack G., Sears M. L., Diamondstone T. J. *J. Biol. Chem.*, 1963, 238, p. 302.
- Litwack G., Singer S. In: «Biochemical Actions of Hormones» ed. by G. Litwack, v. II, A. P., New York—London, 1972.
- Lockwood D. H., Stockdale F. E., Topper Y. J. *Science*, 1967, 156, p. 945—947.
- Loeb J. N., Kimberg D. V. *J. Cell. Biology*, 1970, 46, p. 17.
- Ludens J. H., Fanestil D. D. *Biochem. Biophys. Acta*, 1971, 244, p. 360—371.
- Lyon M. F., Howkes S. G. *Nature*, 1970, 227, p. 1217.
- Mainwaring W. J. P. *J. Endocrinology*, 1969, 45, p. 531.
- Mainwaring W. J. P., Mangan F. R., Peterken B. M. *Biochem. J.*, 1971, 123, p. 619—628.
- Mante-Bouscayrol S. [et al.]. *Gen. Comp. Endocrinology*, 1962, 21, p. 93.
- Maurer H. R., Chalkey G. R. *J. Mol. Biol.*, 1967, 27, p. 431.
- Mayewski R. J., Litwack G. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1969, 37, p. 729.
- McGuire W. L., O'Malley B. W. *Biochem. Biophys. Acta*, 1968, 157, p. 187.
- McGuire W. L., De Della C. *Endocrinology*, 1971, 88, p. 1099.
- McGregor R., Mohler H. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1967, 120, p. 136.
- McMachon E. M., de Witt W. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1968, 31, p. 176.
- Milgrom E., Atger M., Baulieu E. E. *Steroids*, 1970, 16, p. 741.



- Milgrom E., Baulieu E. E. *Endocrinology*, 1970, 87, p. 276.
- Mohla S., De Sombre E. R., Jensen E. V. *Federation proc.*, 1971, 30, p. 1214.
- Milin B., Roy A. K. *Nat. New Biol.*, 1973, 242, p. 248—250.
- Moss B., Ingram V. M. *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S.*, 1965, 54, p. 967.
- Moss B., Ingram V. M. *J. Mol. Biol.*, 1968, 32, p. 493.
- Mousseron-Canet M. *Biochem. Biophys. Acta*, 1971, 232, p. 117.
- Mousseron-Canet M. [et al.]. In: «Advances in the Biosciences» (Raspe G. ed.), v. 47, p. 72—74, 1971.
- Mousseron-Canet M. [et al.]. *Biochem. J.*, 1971a, 12, p. 471.
- Müller-Hill B. *Nature*, 1972, 237, N. 5356, p. 428.
- Musliner T. A., Shader G. J., Villee C. A. *Biochemistry*, 1970, 9, p. 4448.
- Musliner T. A., Shader G. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1971, 45, 4, p. 998—1004.
- Musliner T. A., Shader G. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1971, 45, 4, p. 998—1004.
- Musliner T. A., Shader G. J. *Biochem. Biophys. Acta*, 1972, 262, p. 256.
- Müller C., Totsuka A., Zahn R. K. *Biochem. Biophys. Acta*, 1974, 336, p. 224—233.
- Neufeld G. J., Thompson J. A., Horn D. S. H. *J. Insect. Physiol.*, 1968, 14, p. 789.
- Nevil D. M. *J. Biol. Chem.* 1971, 246, N 20, p. 6338.
- Nichol C. A., Rosen T. In: «Actions of Hormones on Molecular processes». (G. Litwack and G. Kritchewsky, eds.) Wiley, New York, 1964.
- Nicolette J. A., Mahieu M. A., Muller G. C. *Biochem. Biophys. Acta*, 1968, 166, p. 403.
- Ohshima Y., Matsuura M., Harinchi T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1972, 47, N 6, p. 1444—1450.
- Ohtsuka R., Koide S. S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1969, 35, p. 648.
- Okazaki R. [et al.]. *Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol.*, 1968, 33, p. 129.
- O'Malley B. W. *Transactions New York Acad. Sci.*, 1969, 31, N. 5, p. 478—503.
- O'Malley B. W., Kochler P. O. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1967, 28, p. 1.
- O'Malley B. W., McGuire M. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 1968, 60, N 4, p. 1527.
- O'Malley B. W. [et al.]. *Recent Progr. Hormone Res.*, 1969, 25, p. 105.
- O'Malley B. W., Sherman M. R., Toft D. O. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 1970, 67, 501.
- O'Malley B. W., Toft D. O., Sherman M. R. *J. Biol. Chem.*, 1971, 246, p. 1117.
- Oppenheimer G. H. [et al.]. *Clin. Endocr. Metab.*, 1972, 35, p. 330—333.
- Oppenheimer G. H. [et al.]. *Clin. Investigation*, 1973, 52, N 62 (Abstract).
- Pages R. A., Robbins J., Edelhoch H. *Biochemistry*, 1973, 12, N 14, p. 2773.
- Pastan J., Perlman R. *Nature New Biol.*, 1971, 229, p. 5.
- Patel N., Madhavan K. J. *J. Insect. Physiol.*, 1969, 15, p. 2141.
- Paul J., Gilmour R. S. *J. Mol. Biol.*, 1968, p. 305.
- Paul J., Gilmour R. S. *J. Mol. Biol.*, 1969, 40, p. 137.
- Pavan C., Brener M. E. *Chromosoma*, 1955, 7, p. 371—386.
- Pirrotta B., Chadwick P., Ptashne M. *Nature*, 1970, 227, p. 41.
- Potter V. R. [et al.]. *Adv. Enzyme Regulation*, 1967, 5, p. 313.
- Ptashne M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 1967, 57, p. 306.
- Puca G. A., Bresciani F. *Nature*, 1968, 218, p. 967.
- Rancourt M. W., Litwack G. *Exptl. Cell. Res.*, 1968, 51, p. 413.
- Raynaud-Jammet G., Baulieu E. E. *Compt. Rend.*, 1969, D 268, N 32, p. 11.
- Raz A., Goodman D. J. *J. Biol. Chem.*, 1969, 244, N 12, p. 3230.
- Reel J. R., Kenney F. T. 3rd. *International Congr. Endocrinology, Mexico*, 148, 1968.

- Riggs A. D., Suzuki H., Bourgeois S. J. *Biol. Mol.*, 1970, 48, p. 67.
- Robinson G. R. *Biochem. J.*, 1949, 45, p. 68.
- Robinson G. A., Butcher R. W., Sutherland E. W. *Cyclic AMP*. Acad. Press, New York—London, 1971.
- Rochefort H., Baulieu E. E. *Endocrinology*, 1969, 84, p. 108.
- Rosen G. M., Liarakos C. D., O'Malley B. W. *Biochemistry*, 1973, 12, N 15, p. 2803—2809.
- Roy A. K., Milin B. C., McMinn D. M. *Biochem. Biophys. Acta*, 1974, 354, p. 213—232.
- Sahota T. S., Mansingh A. J. *Insect. Physiol.*, 1970, 16, p. 1649.
- Sala-Trepat J. M., Reti E. *Biochem. Biophys. Acta*, 1974, 338, p. 92—103.
- Samuels H. H., Tomkins G. M. J. *Mol. Biol.*, 1970, 52, p. 57.
- Samuels H. H., Tsai G. S. J. *Clin. Invest.*, 1973, 52, N 72 (Abstract.).
- Samuels H. H., Tsai G. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 1973a, 70, p. 3488—3492.
- Samuels H. H., Tsai G. S. J. *Clin. Invest.*, 1974, 53, p. 656—659.
- Sanders L. A., Soheichter N. M., McCarty K. S. *Biochemistry*, 1973, 12, p. 783.
- Scatchard G. *Ann. New York. Acad. Sci.*, 1949, 51, p. 660.
- Schäfer G., Nägel L. *Biochem. Biophys. Acta*, 1968, 162, p. 617.
- Segal H. L., Kim G. S. J. *Cell. Compar. Phys.*, 1965, 66, N 2, p. 11.
- Sella P. B., Stein O., Gress J. *Endocrinology*, 91, N, 1, 1972.
- Shea M., Kleinsmith L. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 1973, 50, p. 473.
- Sheehan D. M., Olins D. E. *Biochem. Biophys. Acta*, 1974, 353, p. 438.
- Shelton K. R., Allfrey W. G. *Nature*, 1970, 228, p. 132.
- Shigematsu H., Moriyama H. J. *Insect. Physiology*, 1970, 16, p. 2015.
- Shimada H. *Sci. Papers Cell. Gen. Educat. Univ., Tokyo*, 1963, 13, p. 231.
- Shyamala G., Gorski J. *Biol. Chem.*, 1969, 244, p. 1097.
- Sluyser M. J. *Mol. Biol.*, 1966, 19, p. 591.
- Sluyser M. J. *Mol. Biol.*, 1966a, 22, p. 441.
- Sluyser M. *Biochem. Biophys. Acta*, 1968, 154, p. 606.
- Sluyser M. *Biochem. Biophys. Acta*, 1969, 182, p. 235.
- Smith R. E., Szego C. M. Abstracts, 53rd Meeting Endocrine Soc., San-Francisco, 1971, p. 151.
- Smuckler E. A., Tata J. R. *Nature*, 1971, 234, p. 37—39.
- Sobel B. E., Dempsey P. J., Cooper T. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1969, 132, p. 6.
- Sokoloff L. In: «Regulatory Mechanisms for Protein Synthesis in mamalian Cells». Acad. Press, New York. — London, p. 345, 1968.
- Sokoloff L., Kaufman S. *Science*, 1959, 129, p. 569.
- Sokoloff L., Kaufman S. J. *Biol. Chem.*, 1961, 236, p. 795.
- Sokoloff L. [et al.]. *Biochem. Biophys. Acta*, 1963, 76, p. 329.
- Sokoloff L., Kaufman S., Gelboin H. V. J. *Biol. Chem.*, 1963a, 238, p. 1432.
- Sokoloff L., Roberts P. A. J. *Biol. Chem.*, 1974, 249, N 17, p. 5520—5526.
- Spaulding W., Davis J. *Biochem. Biophys. Acta*, 1971, 229, N 1, p. 20.
- Spelsberg T. C., Hnilica L. S., Asevin A. T. *Biochem. Biophys. Acta*, 1971, 228, p. 550.
- Spelsberg T. C. [et al.]. *J. Biol. Chem.*, 1972, 274, p. 1368.
- Spirin A. S. *Europ. J. Biochem.*, 1969, 10, p. 20.
- Stackhouse H. L., Chetsanga C. J., Tan C. H. *Biochem. Biophys. Acta*, 1968, 155, p. 159.
- Steggles A. W., King R. J. B. *Endocrinology Suppl.*, 1969, 138, p. 36.
- Steggles A. W., King R. J. B. *Biochem. J.*, 1970, 118, p. 695.
- Steggles A. W. [et al.]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 1971, 68, p. 1479.
- Stein G., Chaudhuri S., Baserga R. J. *Biol. Chem.*, 1972, 149, p. 3918.
- Stocker A. J., Pavan C. *Chromosoma*, 1974, 45, p. 295—319.
- Stone A. L., Bradley D. T. J. *Amer. Chem. Soc.*, 1961, 83, p. 3627.
- Stone G. M. *Acta Endocrinol.*, 1964, 47, p. 433.
- Stumpf W. E., Roth L. J. J. *Histochem. Cytochem.*, 1966, 14, p. 274.



- Sufi S. B. [et al.]. *J. Endocrin.*, 1973, 58, N 1, p. 41—52.
- Sunaga K., Koide S. S. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1967, 122, p. 670.
- Sunaga K., Koide S. S. *Steroids*, 1967 a, 9, p. 541.
- Sunaga K., Koide S. S. *J. Pharm. Sci.*, 1968, 57, p. 2116.
- Surks M. J. [et al.]. *J. Biol. Chem.*, 1973, 248, p. 7066—7072.
- Tabachnik K. M. *J. Biol. Chem.*, 1967, 242, p. 1646.
- Takahashi K. *J. Biol. Chem.*, 1968, 243, p. 6171.
- Talwar G. P. [et al.]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 1964, 52, p. 1059.
- Tapley D. F., Basso N. *Biochem. Biophys. Acta*, 1959, 36, p. 486.
- Tata J. R. *Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med.*, 1957, 95, p. 11.
- Tata J. R. *Biochem. Biophys. Acta*, 1958, 28, p. 91.
- Tata J. R. *Nature*, 1960, 187, p. 1025.
- Tata J. R. In: «Action of Hormones on Molecular Processes». New York—London—Sydney, p. 58, 1964.
- Tata J. R. *Biochem. J.*, 1965, 97, p. 915.
- Tata J. R. In: «Mechanisms of Hormone Actions», p. 173, 1965.
- Tata J. R. *Nature*, 1967, 213, p. 566.
- Tata J. R. *Acta Endocrinology*, 1967a, 124, p. 111.
- Tata J. R. *Nature*, 1968, 219, p. 331—338.
- Tata J. R. In: «Regulatory Mechanisms for protein synthesis Mammalian Cells», New York—London, p. 299, 1968a.
- Tata J. R. *Biochem. J.*, 1970, 116, p. 617.
- Tata J. R., Widnell C. P. *Bioch. J.*, 1966, 98, p. 604.
- Tata J. R., Williams-Ashman H. G. *Europ. J. Biochem.*, 1967, 2, p. 366—374.
- Teng C. S., Hamilton T. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 1968, 60, p. 1410.
- Teng C. S., Hamilton T. H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1970, 40, N 5, 1231.
- Teng C. T., Teng C. S., Allfrey V. G. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1970, 41, p. 690.
- Teng C. S., Teng C. T., Allfrey V. G., *J. Biol. Chem.*, 1971, 246, p. 3597.
- Tettenborn U., Dofuku R., Ohno S. *Nature New Biol.*, 1971, 234, p. 37.
- Thomopoulos P., Dastugue B., Defer N. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1974, 58, N 2, p. 499—505.
- Thompson E. B., Tomkins G. M., Curran J. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 1966, 56, p. 296.
- Thompson E. B., Gramer D. K., Tomkins G. M. *J. Mol. Biol.*, 1970, 54, p. 159—175.
- Toft D. *J. Steroid. Biochem.*, 1972, 3, p. 575.
- Toft D., Gorski J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 1966, 55, p. 6.
- Tomkins G. M., Gelehrter T. O. In: «Biochemical. Actions of Hormones» (G. Litwack ed.) Acad. Press, New York—London, 1972.
- Tomkins G. M. [et al.]. *Cold spring Harbor Sympos. Quant. Biol.*, 1966, 31, p. 349.
- Tomkins G. M. [et al.]. *Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol.*, 1970, 35, p. 635.
- Truong H., Baulieu E. E. *Biochem. Biophys. Acta*, 1971, 237, p. 167.
- T'so P. O. P., Lu P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 1964, 51, p. 17.
- Turkington R. W. *Endocrinology*, 1968, 82, p. 575.
- Turkington R. W. In: «Developmental Aspects of the Cell Cycle» (I. L. Cameron, G. M. Padilla and A. M. Zimmerman, eds.) p. 315—355. Academic Press, New York, 1971.
- Turkington R. W. In: «Biochemical Actions of Hormones», v. II (ed. by G. Litwack) Acad. Press, New York. — London, p. 55—77, 1972.
- Turkington R. W., Lockwood D. H., Topper Y. I. *Biochem. Biophys. Acta*, 1967, 148, p. 475.
- Turkington R. W. [et al.]. *J. Biol. Chem.*, 1968, 243, p. 3382.
- Turkington R. W., Ward O. R. *Biochem. Biophys. Acta*, 1969, 142, 276.
- Udaka S. *Nature*, 1970, 228, p. 336.
- Unhjem O., Tveter K. J., Aakvaag A. *Acta Endocrinology*, 1969, 62, p. 153.

- Vidali G. Boffa L. C., Allfrey V. G. J. Biol. Chem., 1972, 247, p. 7365
- Wang T. Y. J. Biol. Chem., 1967, 242, p. 1220.
- Wang T. Y. Exptl. Cell. Res., 1971, 69, p. 217.
- Weirich G., Karlson P. Arch. Entwicklungschech. Organ, 1969, 164, p. 170.
- Welt F. H. Biochem. J., 1959, 73, p. 13.
- Werthamer S., Samuels A. J., Amaral L. J. Biol. Chem., 1973, 248, p. 6398—6407.
- Whaley R. A., Hart T. M., Kleigaard H. M. Amer. J. Physiol., 1959, 196, p. 1258.
- Wicks W. D. J. Biol. Chem., 1968, 243, p. 900.
- Widnell C. C., Tata J. R. Biochem. Biophys. Acta, 1963, 72, p. 506.
- Widnell C. C., Tata J. R. Biochem. J., 1966, 98, p. 621.
- Williams-Ashman H. G. Biochem. J., 1965, 97, p. 22.
- Williams-Ashman H. G. In: «Advances in Biosciences» (G. Raspe ed), v. 2, p. 200—221, Pergamon Press, Oxford, 1969.
- Williams-Ashman H. G. In: «The androgens of the testis». (K. B. Eir-Nes ed.), p. 117—144, Dekker, New York, 1970.
- Williams-Ashman H. G. Reddi A. H. Ann. Rev. Physiol., 1971, 33, p. 31.
- Williams-Ashman H. G., Reddi A. H. In: «Biochemical Actions of Hormones», v. 11 (Litwack G., ed.), A. P. New York—London, 1972.
- Williams D., Gorski J. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 1972, 69, p. 3464—3468.
- Williams D., Gorski J. Biochemistry, 1973, 12, p. 297.
- Willee J. J., Barnet C. F., Ehreck C. F., Biochem. Biophys. Res. Commun, 1972, 46, N 2, p. 685—691.
- Wilson E. M., Spelsberg T. C. Biochem. Biophys. Acta, 1973, 322, p. 145—154.
- Wyatt G. R. In: «Biochemical actions of Hormones», II (ed. Litwack G.) New York—London, Acad. Press, p. 386—470, 1972.
- Wyatt G. R., Linzen B. Biochem. Biophys. Acta, 1965, 103, p. 588.
- Wyss R. H., Heinrichs W. L., Herrmann W. L. Clin. Endocrin. Metab., 1968, 28, p. 1824.
- Yamomoto K. R., Alberts B. M. Proc. Natl. Acad. Sci. US., 1972, 69, p. 2105.
- Yu F., Feigelson P. Proc. Natl. Acad. Sci. US., 1971, 68, p. 2177.
- Yudaev N. A., Pokrowsky B. B. Endocrinol. Experiment, 1972, 6, p. 131.
- Zetterberg A., Auer G. Exptl. Cell. Res. 1969, 58, p. 464.
- Zetterberg A., Auer G. Exptl. Cell. Res., 1970, 61, p. 254.
- Zimmering P. E., Kahn J., Lieberman S. Biochemistry, 1970, 9, p. 2498.
- Zubay G., Schwartz D., Beckwith G. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1970, 66, p. 104.
- Zubay G., Gielow L., Englesberg E. Nature New Biol., 1971, 232, p. 164.



## ГЛАВА II

# ВЛИЯНИЕ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ НА СТРУКТУРУ И ФУНКЦИЮ МИТОХОНДРИЙ В РАЗВИТИИ

## ДЕЙСТВИЕ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ НА РОСТ И РАЗВИТИЕ

Одно из наиболее ярких проявлений действия тироксина — стимуляция метаморфоза у амфибий, открытая J. F. Gudernatsch (1912) при скармливании эмбрионам лягушек щитовидной железы лошадей. При этом у головастика резорбируются плавательные части, увеличиваются задние конечности, а затем и передние, необходимые для наземного образа жизни, укорачивается кишечник, что должно предшествовать переходу к животному корму.

У тиреоидэктомированных головастиков отсутствует метаморфоз. Все ткани и системы находятся под непосредственным контролем тиреоидных гормонов. Имплантация небольшого кусочка тироксинсодержащего агара или холестерина в различные части организма оказывает локальное метаморфогенное действие (Kaltenbach, 1973). Это означает, что ткани обладают прямой чувствительностью к тироксину.

Головастик чрезвычайно чувствителен к действию тироксина. Концентрация 1 мкг на литр ( $10^{-9}$  М) оказывает минимальный эффект на головастиков при 25°C, тогда как нормальная концентрация его в человеческой плазме —  $10^{-8}$  М, а используемый *in vitro* биохимический тест для определения активности тироксина —  $10^{-5}$  и  $10^{-4}$  М. Трийодтиронин значительно более эффективен (в 300 раз) и всасывается гораздо быстрее тироксина.

Чувствительность отдельных тканей к тиреоидному гормону различна и изменяется с течением времени. Концентрация тиреоидных гормонов в крови и тканях головастика в начале метаморфоза низкая, затем достигает максимума и перед завершением метаморфоза снижается (Saxen et al., 1957). При высоких концентрациях тироксина происходит быстрый, некоординированный, атипичный метаморфоз, который обычно заканчивается гибелью организма. При тиреоидэктомии метаморфоз может регулироваться очень низкими концентрациями тироксина ( $10^{-9}$  М) и происходит частично. В этом случае головастика можно сохранить в стабильных условиях в течение года и довести до последней стадии развития (Kollros, 1959). Амфибии различаются по скорости и степе-



ни метаморфоза, а также по продукции тиреоидного гормона. У некоторых видов амфибий (*Rana esculenta*, *Rana Catesbiana*), проводящих в стадии головастиков несколько лет, при даче тироксина ускоряется полный метаморфоз. Виды и популяции саламандр, отличающиеся от нормальных видов длительностью личиночного периода (*Triton alpestris*, *Triton Taeniatus*, *Ambystoma biggini*), ускоряли метаморфоз при действии тироксина, однако требовались довольно большие его концентрации —  $10^{-5}$ — $10^{-6}$  М. У некоторых видов саламандр (*Eurycea tynerensis*), которые постоянно находятся и размножаются в личиночной стадии, при таких же дозах наступает лишь частичный метаморфоз, они чувствительны к гораздо более высоким дозам гормона (Gorbman, 1967).

Метаморфоз, контролируемый тироксином, является феноменом, свойственным амфибиям, однако существует менее яркий морфологический эффект тиреоидных гормонов — «эффект созревания». Он заключается в стимуляции роста, активации развития скелета, кожи, гонад и регенерации. Необходимо осторожно использовать слово «созревание», описывая структурные изменения, стимулируемые тироксином. Следует помнить, что все гормоны (гипофиза, гонад и др.) способствуют переходу из недоразвитого состояния в развитое, что также называется созреванием.

Известно, что тиреоидэктомированные молодые животные плохо растут. Существуют разногласия в объяснении специфической роли тиреоидных гормонов в соматическом росте. Это обусловлено значительными различиями применяемых доз, вызывающих активацию различного уровня, а также тем, что последствием тиреоидэктомии являются метаболические нарушения организма, в результате чего нарушается рост. Роль тиреоидных гормонов может заключаться только в создании благоприятных условий, в которых истинные ростовые факторы хорошо выражены.

У молодых рыб (например, *Lebistes*) тиреоидэктомия замедляет рост, в то время как радиотиреоидэктомированные лососи растут нормально. У головастиков тиреоидэктомия приводит к ненормальному увеличению роста, тироксин же явно останавливает рост тем, что ускоряет потерю воды тканями и вызывает быстрое снижение веса тела (Gorbman, 1967).

Н. М. Evans et al. (1939) провели тщательный анализ и сравнение действия гормона роста и тироксина на птиц и определили, что гормон роста значительно стимулирует рост у тиреоидэктомированных птиц. Введение тироксина (5γ в день) нормализует скорость роста и основной обмен. Однако тироксин не эффективен при гипофизэктомии. Таким образом, тироксин может быть активен как синергист гормона роста, но сам не обладает способностью стимулировать рост.

Тиреоидные гормоны играют вспомогательную роль в росте и основную в дифференциации.



Головастики становятся «гигантскими» в отсутствие тиреоидных гормонов, но не способны к прогрессивному развитию. Внутренний скелет также является мишенью для тироксина, однако влияние на него отличается от действия на рост и дифференциацию. При кормлении метилтиоурацилом беременных крыс происходит задержка центров окостенения у зародышей (Weiss and Noback, 1949), но это рассматривается (Jost, 1960) как один из аспектов задержки общего развития, а не дифференцировки, так как нарушение уровня окисления не поддается лечению.

Проблема регулирования влияния тиреоидных гормонов на зародышевое развитие связана с фактом поставки зародышу тиреоидного гормона из 2 источников. На определенной стадии до рождения (сроки для каждого вида специфичны) зародышевая щитовидная железа начинает секретировать гормон. На ранней стадии зародышевая ткань получает материнский тиреоидный гормон путем транспорта через плаценту. Поэтому при удалении щитовидной железы у матери нарушается развитие эмбриональной ткани. Предполагается, что на большую часть видов тиреоидные гормоны влияют незначительно на ранней стадии зародышевого развития, но регулируют последнюю стадию, когда начинает секретировать щитовидная железа зародыша. Подтверждением является то, что при врожденной аплазии щитовидной железы у людей происходит задержка окостенения хрящей (Wilkins, 1957).

У тиреоидэктомированных крыс растут кости, увеличивается вес тела, но задерживается развитие гистологической структуры, которая возвращается к юношескому типу. Гипофизарный гормон роста может влиять на рост, стимулируя пролиферацию эпифизальных хрящей, однако дифференциация происходит незначительно или вовсе не происходит. С другой стороны, когда тироксин дают незрелым гипофизэктомированным крысам, наблюдается быстрая дифференциация и оссификация эпифизов длинных костей без заметного эффективного удлинения. У различных видов млекопитающих прорезывание и рост зубов находятся под контролем щитовидной железы (Gogbman, 1967).

### **ВЛИЯНИЕ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА**

При недостатке тиреоидного гормона в пренатальном онтогенезе задерживается развитие скелета и некоторых других органов. У млекопитающих рост, дифференциация и развитие большей части систем стимулируются тиреоидными гормонами (Gogbman, 1963; Rall et al., 1964), но две из них особенно чувствительны: скелетная мускулатура и нервная система. Клинические исследования врожденного гипотиреоза выявили связь между этой болезнью и поражением центральной нервной системы (Smith, 1957).



Опубликовано много работ, посвященных роли тиреоидных гормонов в развитии функции мозга (Eaugs, 1966). Тиреоидэктомия приводит к отставанию в развитии мозга, которое устраняется гормональным лечением (Eaugs, 1968). Подобное влияние связано со структурными и биохимическими изменениями в развивающемся мозге (Legrand, 1967; Hamburger, 1968; Balazs, 1968).

Эффекты нейрохимического развития противоположны гипотиреозу (Balazs, 1970 a). Введение тиреоидных гормонов крысам ускоряет развитие энергетического метаболизма мозга (Cocks et al., 1970), созревание нейронов (Scharigo, 1968) и проявление метаболической гетерогенности мозга. Введение тироксина животным после рождения ведет к преждевременной пролиферации, что ускоряет дифференциацию клеток мозга (Balazs, 1971).

Установлено, что у амфибий нервная система наиболее чувствительна к действию тиреоидных гормонов (Etkin, 1964), и процессы роста и развития головного мозга у млекопитающих напоминают метаморфоз амфибий.

У детенышей кошек, кроликов и крыс развитие головного мозга продолжается в течение 30 дней постнатальной жизни гистологически (Eaugs and Goodhead, 1959; Schade et al., 1964, Rigriga et al., 1964) и биохимически (Speggy, 1964; Himwich, 1962). В течение этого периода активность большинства ферментов заметно повышается (Pasquini et al., 1967; Garcia Argiz et al., 1967), метаболизм глюкозных изменений приближается к таковому у взрослого головного мозга (Chittoni and Gomez, 1964; Gomez and Ramirez de Guglielmone, 1967). Эти процессы связаны с активным формированием разнообразных мембран, ассоциирующихся с образованием аминокислот (Berl, 1965). В течение указанного периода синтез белков в головном мозге достигает наибольшей активности (Lajtha, 1964), а белковый синтез контролируется гормонами щитовидной железы, связан с действием тироксина на рост и развитие (Tata, 1971) и соответствует в некоторых аспектах биохимической дифференциации головного мозга. Однако результаты изучения влияния тиреоидных гормонов на белковый синтез в мозге весьма противоречивы. Многие исследователи утверждают, что белковый синтез в развитии головного мозга стимулируется тиреоидными гормонами, однако механизм стимуляции не до конца выяснен (Michels et al., 1963; Gelberg et al., 1964; Geel, Timiras, 1967; Balazs and Gaitonde, 1968).

C. J. Gomez (1971) исследовал синтез РНК в ткани мозга у новорожденных крыс. Неонатальная тиреоидэктомия снижала содержание РНК, что свидетельствует об угнетении белкового синтеза. R. Balazs et al. (1971), S. E. Geel, P. S. Timiras (1971) не наблюдали изменений в синтезе РНК у кретинотных крысят. В то же время включение  $C^{14}$ -лейцина в субцеллюлярные фракции гомогената мозга при тиреоидэктомии было снижено, но тиреоидные гормоны при введении новорожденным животным не



повышали синтез белка, также как и у взрослых крыс (Eaуrs, 1964).

Усиление миэлинизации центральной нервной системы у молодых животных указывает на начало дифференциации, которая наблюдается в первые 30 дней после рождения. В культуре клеток мозжечка (Hamburgh, 1968) в присутствии тироксина повышался уровень холестерина, содержащего миэлин. S. Sharigo (1966), N. B. Myant and L. A. Cole (1966) сообщали о повышении содержания холестерина и фосфолипидов у молодых крыс при лечении тиреоидными гормонами. Понижение содержания цереброзидов, а также холестерина и фосфолипидов, липидных компонентов миэлиновой фракции мозга наблюдается у тиреоидэктомированных новорожденных крыс (Balazs et al., 1969). Такая специфическая регуляция тиреоидными гормонами процесса миэлинизации мозга отмечается только в первые 30 дней после рождения (с 15-го по 25-й дни) (Guarop, 1963). Исследование влияния гормонов щитовидной железы на ферменты, участвующие в процессах миэлинизации, также показало, что после рождения наблюдается критический этап, когда для нормального развития этих ферментов необходим адекватный уровень тиреоидных гормонов (Wysocki and Segal, 1972).

Взрослый мозг — одна из немногих тканей, которая не увеличивает скорость дыхания в ответ на тироксин. У новорожденных (Fazekas et al., 1951) при введении тироксина потребление кислорода срезами мозга повышается, однако нет явного проявления энзимной индукции. Это совпадает с наблюдениями W. W. Westerfield, (1965) и N. E. Kandemir et al. (1966), которые определили, что изолированные митохондрии 1—5-дневных крыс сильнее реагируют на тироксин, чем митохондрии взрослых крыс. Определение потребления кислорода с сукцинатом в качестве субстрата дыхания митохондрий коры мозга крыс в возрасте 10, 14, 25 и 90 дней показало, что тиреоидэктомия во всех возрастных группах значительно понижала поглощение  $O_2$  митохондриями (Tzojnova and Mourek, 1973).

Введение в организм взрослого животного тироксина или трийодтиронина сопровождается увеличением количества некоторых ферментов окисления, причем наиболее отчетливо проявляется в увеличении содержания митохондриальной  $\alpha$ -глицерофосфатдегидрогеназы. В тех органах, где не наблюдается повышения потребления кислорода в ответ на тироксин (мозг), содержание  $\alpha$ -глицерофосфатдегидрогеназы не меняется (Lardy et al., 1960). У крыс количество этого фермента резко повышается в первые 30 дней после рождения. Это повышение активности растворимой  $\alpha$ -глицерофосфатдегидрогеназы, связанной с НАД, значительно нарушалось у крыс с гипотиреозом в однодневном возрасте; у 20-дневных тиреоидэктомия значительно слабее подавляла активность этого фермента (Schwark et al., 1971).



Одна из характерных черт энергетического метаболизма взрослого мозга — преобладание глюкозы как субстрата окисления (Balazs, 1970 b). Характеристика основ энергетического метаболизма в ткани мозга включает быстрое и обширное внедрение углерода глюкозы в аминокислоты. Этот феномен связан с быстрым разрушением  $C^{14}$ -глюкозы в ткани головного мозга и включением его в цикл трикарбоновых кислот. Скорость изменения трансаминирования прочно связана с течением цикла трикарбоновых кислот. Пул глутамата и других аминокислот быстро уравнивается с соответствующим интермедиатным циклом, углерод глюкозы включается в пул аминокислот после обоих окислений  $CO_2$ . Это явление метаболизма головного мозга развивается в течение онтогенеза в период с 10-го по 19-й день после рождения. При недостаточности щитовидной железы нарастание слабее, а с 14-го дня прекращается совсем. У интактных крысят, которым от рождения до 19-го дня вводили подкожно трийодтиронин в дозе 0,5—1,5  $\mu$ , включение метки в аминокислоты было несколько выше нормы, особенно в первые две недели жизни. Активность митохондриального энзима — трансаминазы, непосредственно связанная с этим феноменом, повышается к 40-му дню в 17 раз; тиреоидэктомия угнетает эту активность (Gomez, 1971).

Активация дыхания ионами калия в ткани мозга наблюдается в период между 10-м и 15-м днями (Greengard and McIlwain, 1955), что, вероятно, связано с активацией катион-стимулируемой аденозинтрифосфатазы, приводящей к повышению содержания АДФ и фосфата и в дальнейшем к увеличению скорости утилизации глюкозы. По мнению R. B. Tobin and H. A. McIlwain (1965); R. B. Tobin and E. C. Slater (1965); S. Minakami et al. (1963), подобные реакции связаны с регуляцией функции митохондрий, у которых АДФ и  $P_H$  стимулируют цикл трикарбоновых кислот.

Кортикальный ответ на высокий уровень  $K$  в клетке совпадает с периодом повышения содержания  $K^+$  и понижения  $Na^+$  и  $Cl^-$  (Vergadakis and Woodbury, 1952), а также с пиком активности катионстимулируемой аденозинтрифосфатазы (Sampson and Quinn, 1967) и активностью митохондриальных энзимов (Pasquini et al., 1967; Garcia Argiz et al., 1967).

Гипо- и гипертиреонизм, индуцированные в постнатальном периоде у крыс, производят небольшие транзиторные изменения в дыхании срезов головного мозга (Chittoni and Gomez, 1964; Fazekas et al., 1951; Hamburgh et al., 1964). Gomez (1971), Gomez and Ramirez de Guglielmone (1967) при неонатальной тиреоидэктомии производимой после 10-го дня, наблюдали депрессию дыхания срезов головного мозга в среде с высоким содержанием  $K^+$ . Одновременно снижался синтез аминокислот из меченой глюкозы. Авторы пришли к заключению, что неонатальная тиреоидэктомия влияет на формирование мембран, развитие их функций. Нейро-



гистологические исследования J. T. Eayrs et al. (1961, 1964) показали, что неонатальная тиреоидэктомия задерживает развитие структурной организации мембран нервных клеток. Гипотиреозидизм также вызывает угнетение активности энзимов, связанных с мембраной.

При нормальном развитии активность сукцинатдегидрогеназы резко повышается, особенно между 10-м и 20-м днями. В мозгу кретинонидных крыс наблюдается угнетение с 10-го дня развития (Hamburgh and Flexner, 1957; Garcia Argiz et al., 1967), уровень других митохондриальных энзимов, аспартатаминотрансфераз и ацетилхолинэстераз, также понижается (Geel and Timigas, 1967; Gomez, 1971). Таким образом, недостаточность тиреоидной функции после рождения сказывается на синтезе ферментов, являющихся составной частью митохондриальных мембран.

Исследования действия тиреоидных гормонов на ионный состав головного мозга (Valcana and Timigas, 1971) продемонстрировали повышение содержания  $\text{Na}^+$  и понижение  $\text{K}^+$  при гипотиреозидизме в коре головного мозга и в мозжечке, отмеченное впервые на 22-й день неонатального развития. T. Valcana и P. S. Timigas (1971) наблюдали понижение специфической активности  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  АТФ-азы в тяжелой микросомальной фракции головного мозга при гипотиреозе также на 22-й день постнатального развития.

По данным A. A. Abdel-Latif et al. (1967),  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -активируемая АТФ-аза в больших количествах присутствует в синапсомембранной фракции головного мозга.

Введение тиреоидэктомированным животным тироксина повышает уровень  $\text{K}^+$  и понижает  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ . Что касается катион-стимулируемых АТФ-аз, то специфическая активность  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -активируемой АТФ-азы повышается, а  $\text{Mg}^{++}$  АТФ-азы не изменяется.

A. J. Matty, K. Green (1962) на мембранах изолированной кожи и мочевого пузыря жабы показали, что тироксин ускоряет активный транспорт натрия.

Так как большое количество энергии в головном мозге тратится на активный транспорт (Whittam and Blond, 1964), то понижение потребления  $\text{O}_2$  при гипотиреозидизме в неонатальный период, как упоминалось выше, тесно связано с изменением количества ионов и связанной с ними ферментной системы. D. M. Blond и R. Whittam (1965) показали, что стимуляция  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  АТФ-азы и усиление поглощения кислорода в почках, которое находится под контролем АДФ, происходят параллельно.

С другой стороны, ионные изменения в развивающемся мозге при гипотиреозидизме и введении тироксина связаны с белковым синтезом. Исследования *in vivo* и *in vitro* показали, что белоксинтезирующая система в мозге очень чувствительна к ионным изменениям (Merei and Gallyas, 1964; Lahiri and Lajtha, 1964; Roberts and Zomzely, 1966).



Приведенные данные свидетельствуют, что тиреоидные гормоны, стимулирующие рост и развитие, вызывают изменения энергетического обмена в ткани мозга. Существует мнение, что стимулирующий эффект тиреоидных гормонов на синтез белка в мозге вторичен по отношению к регуляции энергетических процессов, однако то и другое связано с регулирующей ролью гормонов щитовидной железы на рост и развитие.

### ДЕЙСТВИЕ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ НА ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ МЕМБРАННЫЕ СТРУКТУРЫ

Действие тиреоидных гормонов на рост и развитие, также как и метаболические эффекты, обуславливающие рост, объясняются избирательной регуляцией белкового синтеза (Tata, 1969). Дифференцировка и развитие клеток, изменение основ биосинтетической активности связаны с повышением комплекса интерцеллюлярных структур. Клетки-мишени отвечают на гормональную стимуляцию комбинацией различных механизмов, связанных со структурными компонентами клеток (Siekevitz et al., 1968). Исследования гормона роста, андрогенов, эстрогенов и гормонов насекомых показывают, что росторазвивающее действие их основано на индукции синтеза РНК (Cogner, 1965; Tata, 1966, Hamilton, 1968).

Быстрая стимуляция ядерного синтеза РНК в клетках-мишенях — хорошо известная особенность влияния гормонов на рост и развитие незрелых животных. В гормониндуцируемых системах сравнительно быстрый эффект РНК-синтеза предшествует белковому синтезу (Tata, 1968). Начало повышения белковосинтетической активности совпадает с гормониндуцируемым образованием новых рибосом в цитоплазме (Tata, 1967 a). Такие результаты были получены при гормониндуцируемом метаморфозе головастиков (Tata, 1967 b). В тот период, когда заканчивается образование рибосом, совпадающее со стимуляцией белкового синтеза, они крепко связываются с микросомальной мембраной в гормонстимулируемых тканях, в частности в печени при трийодтиронининдуцируемом метаморфозе головастиков. Это вызывает увеличение количества шероховатого эндоплазматического ретикулула. Подобные изменения наблюдались и в ткани молодых тиреоидэктомированных и гипофизэктомированных крыс при введении тиреоидного гормона и гормона роста (Tata, 1967).

Возникает вопрос, происходит ли при гормональной стимуляции простое перераспределение рибосом на имеющихся мембранах или же образуются новые мембраны. Хотя свободные рибосомы, отделенные от мембран, могут вызывать внедрение аминокислот в белки под влиянием гормонов *in vitro*, предполагается, что при *in vivo* стимуляции происходит структурное перераспределение и фактически весь белковый синтез сосредоточивается в прикрепленных к мембране рибосомах (Heushaw et al., 1963).



J. R. Tata (1967) наблюдал усиление включения меченого холина в фосфолипиды микросом, митохондрий и ядра после инъекции  $T_3$  тиреоидэктомированным крысам. Электронно-микроскопические наблюдения Gustafsson et al., (1965) показали, что введение тироксина тиреоидэктомированным крысам приводит к структурным изменениям митохондрий скелетных мышц, выражающимся в увеличении количества крист и одновременном повышении митохондриального дыхания и фосфорилирования. По мнению авторов, тиреоидные гормоны регулируют количество крист и крист-ассоциированных энзимов (Roodyn et al., 1965). Координация пролиферации клеточных структур и биосинтетической активности является особенностью стимулирующего эффекта тиреоидных гормонов на рост и развитие (Tata, 1971).

Вопрос гормональной индукции синтеза специфических энзимов и белков в микросомальных структурах рассмотрен в классических работах P. P. Cohen (1966), E. Frieden (1967), J. R. Tata (1969). Индукция метаморфоза у амфибий — один из наиболее видимых эффектов тиреоидных гормонов, показывающих его роль в дифференциации и развитии. Поразительные морфологические и молекулярные изменения (табл.), находящиеся под контролем тиреоидных гормонов в процессе метаморфоза, объясняют использование этого процесса в качестве уникальной модели для изучения механизма действия на молекулярном уровне вследствие дифференциации и развития.

P. P. Cohen (1970) исследовал синтез митохондриальной карбамилфосфатсинтетазы, ключевого фермента в синтезе мочевины. Концентрация этого фермента может достигать 20% от всех растворимых белков митохондрий (Tatibana, Ito, 1967). Используя высокоочищенные препараты антител из взрослой лягушки, P. P. Cohen показал, что увеличение содержания фермента в печени головастика — результат синтеза его *de novo*. Индукция синтеза фермента предшествует морфологическим изменениям во время метаморфоза головастика.

Ультраструктурные исследования митохондрий показали, что в печени на ранней стадии наблюдается связь эндоплазматического ретикулула с индивидуальными митохондриями. Эндоплазматический ретикулум плотно прилегает к митохондриальной поверхности, это свидетельствует о том, что существует прямой путь для транспорта предшественников митохондриальных энзимов из рибосом эндоплазматического ретикулула.

В течение ранней экспозиции с тироксином наблюдается набухание митохондрий, средний диаметр их сечения равномерно повышается. Митохондрии в печени взрослых лягушек показывают большую плотность матрикса. Вероятно, набухание митохондрий связано с осмотическим эффектом, происходящим в результате быстрого синтеза и транспорта экстрамитохондриальных субъединиц фермента в митохондрии. Набухание и повышение плотности матрикса в последней стадии метаморфоза головастика и



у взрослых лягушек, возможно, является рефлекторным переходом предшественников со сравнительно низким молекулярным весом в высокомолекулярные креатинфосфатсинтетазы.

Глютаматдегидрогеназа, выделенная из печени претаморфозирующих головастиков, имеет специфические физические, кинетические и субстратные свойства (Wiggert and Cohen, 1966), от-

Т а б л и ц а

Биохимические системы, изменяющиеся во время морфогенеза амфибий (Eaton and Frieden, 1969)

Ткань, орган	Биохимическая система	Изменения	Комментарии
Тело	Дыхание	Не повышается, понижается у некоторых видов	Калоригенный ответ спокойный
Эритроциты	Гемоглобин	Угнетение синтеза гемоглобина головастика, индукция синтеза гемоглобина лягушки	Приспособительное связывание кислорода
Белки крови	Биосинтез белков крови (в печени)	Индукция биосинтеза альбумина сыворотки крови, церулоплазмина	Вероятно, необходим для гомеостаза
Печень	Биосинтез RNA	Повышение оборота RNA	Генетическое выражение T, через ДНК
Хвост	Продукция мочевины	Индукция энзимов мочевинообразования	Переход от амниотелизма к уреотелизму
	Синтез гидролитических энзимов лизосомального типа	Стимуляция синтеза катепсина, фосфатазы, глюкуронидазы	Приводит к резорбции хвоста
Кожа	Биосинтез коллагена	Рассасывание коллагена в хвосте и накопление в голове и задней части	Упрочение кожи
Глаза	Светочувствительный пигмент	Сдвиг к родопсину	Угнетение порфиринового синтеза
Тонкий кишечник	Пищеварительные энзимы	Сдвиг от карбогидраз к протеазам	Переход от травоядного состояния к плотоядному
Части зародыша (Limb buds)	Белки, нуклеиновые кислоты	Развитие и рост тканей (кожи, нервов)	Передвижение на суше

личные от фермента, выделенного из печени лягушки (Fahien et al., 1965).

Тироксин стимулирует *de novo* синтез глютаматдегидрогеназы также хорошо, как и растворимые белки митохондрий (Balinsky et al., 1970). Синтез новых энзимов в течение метаморфоза амфибий свидетельствует о том, что под влиянием тироксина происходит биохимическая дифференциация, вовлекающая различные морфо-функциональные системы организма, имеющие приспособо-



бительный характер в период превращения головастика в лягушку. Одновременно происходит коренная перестройка многих систем, результатом которой являются качественные изменения синтеза белков, осуществляемые действием тироксина непосредственно на генетический аппарат клетки. Каждый из новых белков-энзимов играет метаболическую роль, необходимую для нового образа жизни.

## ДИНАМИКА РАЗВИТИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ И УЛЬТРАСТРУКТУРЫ МИТОХОНДРИИ В ОНТОГЕНЕЗЕ

### Развитие структурной организации митохондрий

Проблема становления гормональных механизмов в раннем онтогенезе слабо изучена. Для решения ее важно выявить гормонзависимые процессы, происходящие на ранних стадиях онтогенеза. Чувствительным критерием, определяющим изменение функциональной активности щитовидной железы, является энергетический обмен.

Исследование структуры и функции митохондрий эмбриональных органов на разных этапах развития щитовидной железы представляет несомненный интерес. Существует тесная связь между ультраструктурой, функцией митохондрий как энергетических центров клетки и изменениями функциональной активности тиреоидной железы в эмбриогенезе, отмеченная многими исследователями (Мицкевич, 1966; Romijan et al., 1952; Огородникова, 1969; Газдаров, 1970; Головачев и Надаляк, 1973).

Эмбриональная щитовидная железа по мере физиологической и морфологической дифференцировки включается в регуляцию отдельных процессов метаболизма зародыша.

Созревание щитовидной железы куриных эмбрионов исследовалось многими авторами (Студитский, 1947; Мицкевич, 1957; Рольник, 1968), а также в нашей лаборатории (Мирахмедов, 1975). С помощью  $J^{131}$ , световой и электронной микроскопии установлено, что дифференцировка клеток щитовидной железы начинается с 6—7-го дня инкубации, формирование первых фолликулов и секреция гормона происходит на 10—12-й день; на 15—16-й день гормональный состав ткани щитовидной железы такой же, как у взрослой щитовидной железы (Туйчиев, 1976).

Мы изучали структуру и функцию эмбриональных митохондрий печени и сердца как органов-мишеней действия гормонов щитовидной железы. Методом электронной микроскопии исследовали особенности структурной организации митохондрий в ткани печени и сердца *in situ* и в изолированном состоянии. Сроки проведения исследований соответствовали различным фазам становления функциональной активности щитовидной железы.

Первоначально изучались морфологические и структурные особенности нативной ткани печени и сердца. Из электроно-микро-



скопических снимков ткани печени (рис. 1) видно, что у 9-дневных эмбрионов митохондрии содержатся в клетке в небольшом количестве. Форма их округлая или эллипсоидная с неясно выра-



Рис. 1. Митохондрии ткани печени 9-дневного эмбриона.  
Ув. 35000.

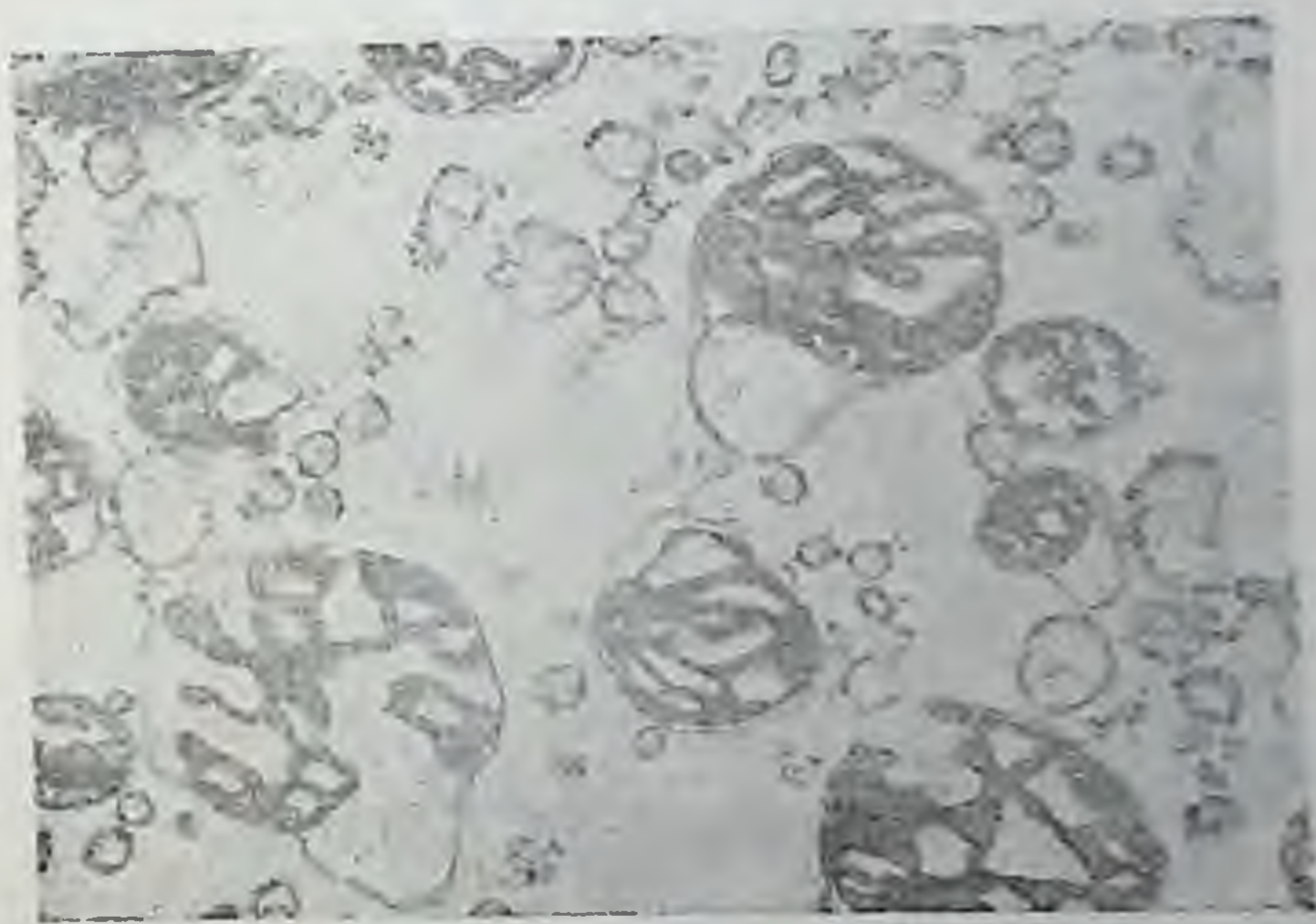


Рис. 2. Митохондрии, выделенные из печени 10-дневного эмбриона. Ув. 18000.

женными кристами, четко различима двухмерная структура мембран, матрикс электронно-оптически светлый. Митохондрии, выделенные из печени в этот период, хотя и полностью сформированы (рис. 2), но больше повреждаются при выделении, чем мито-



хондрии, сформированные на последующих стадиях развития эмбрионов. Хотя, также как и в нативной ткани (*in situ*), в митохондриях отмечается небольшое количество крист и более свет-



Рис. 3. Митохондрии в ткани печени 13-дневного эмбриона Ув. 9000.

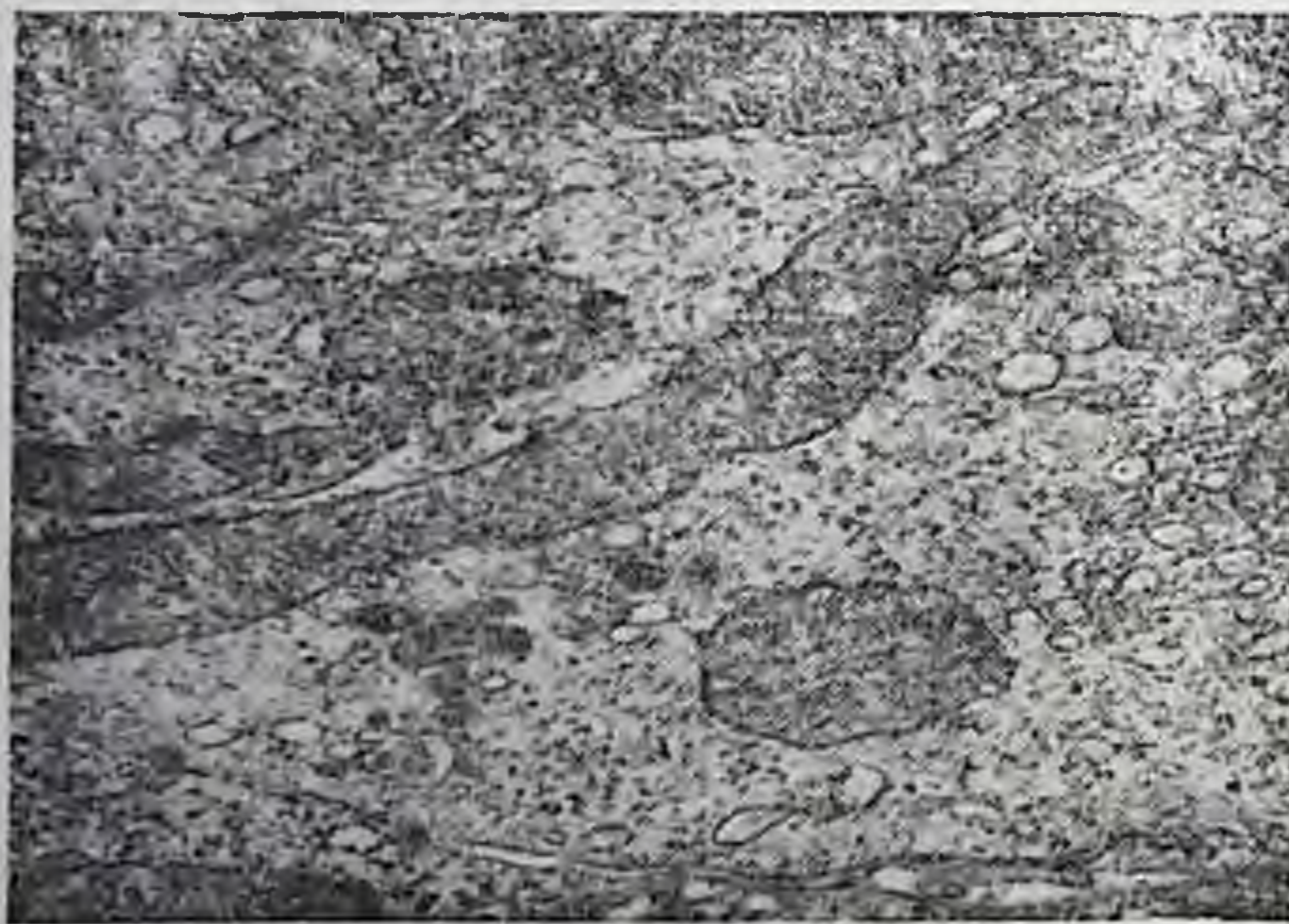


Рис. 4. Митохондрии в ткани печени 18-дневного эмбриона Ув. 12000

лый матрикс, внутрикристное пространство сильно расширено. Морфологическое изучение ткани печени 13-дневных зародышей показало, что митохондрии в большинстве округлые, небольшого размера, с четко выраженными кристами (рис. 3). Структура выделенных митохондрий более совершенная, крист больше, меж-



кристовое пространство сжато, матрикс имеет ясно различимую крупнозернистую структуру. По сравнению с ранними сроками, у 17—18-дневных эмбрионов форма митохондрий более разнообраз-

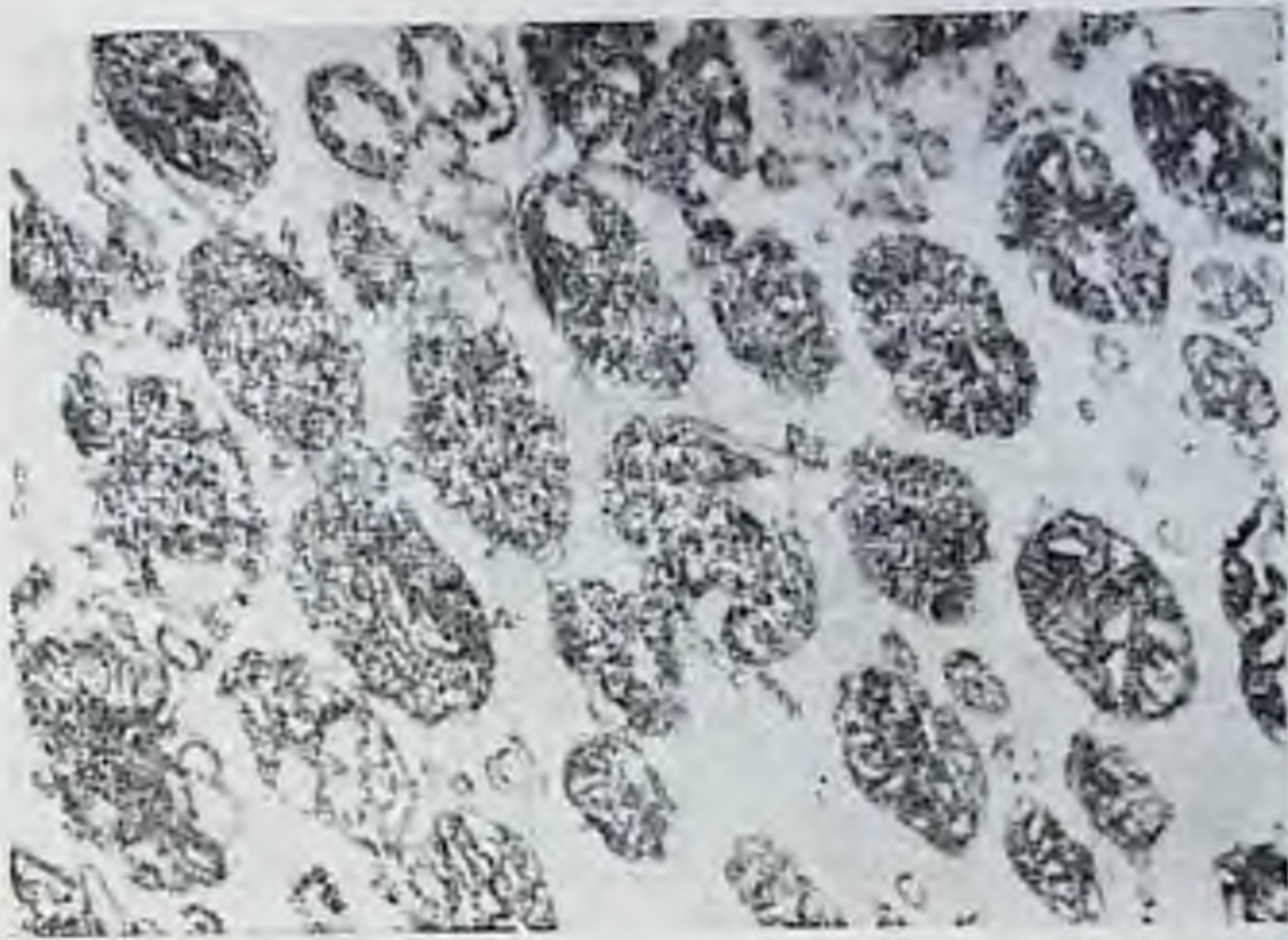


Рис. 5. Митохондрии, выделенные из печени 18-дневных эмбрионов. Ув. 12 000.



Рис. 6. Клетки сердечной мышцы 9-дневного эмбриона. Ув. 12 200.

разна (рис. 4), много вытянутых, кольцевидных, эллипсоидных, что обусловлено усилением митохондриогенеза. Большое количество четко выраженных крист. Изолированные митохондрии



имеют более сложную архитектуру (рис. 5) — в виде тонких изогнутых линий, матрикс темный.

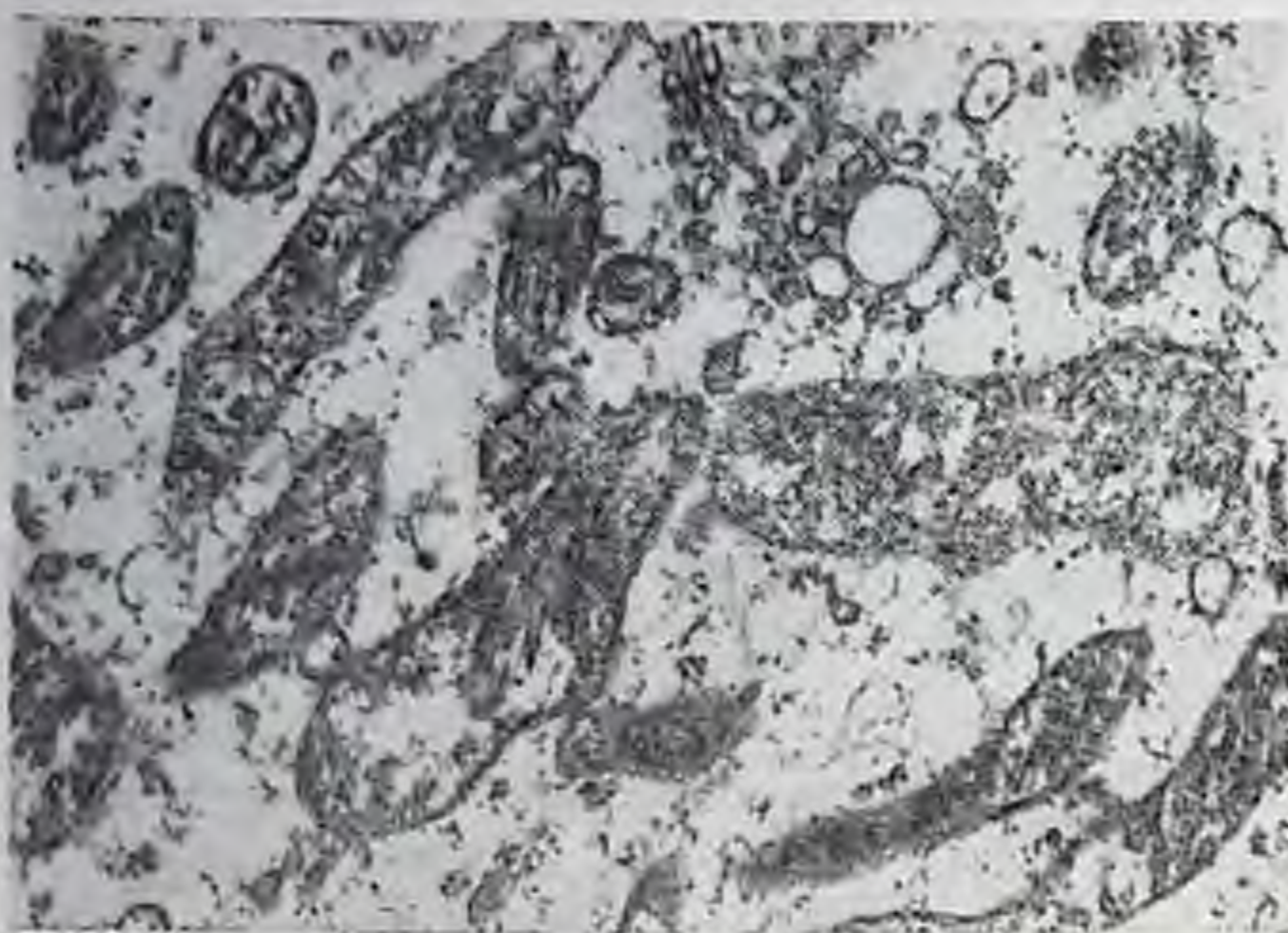


Рис. 7. Митохондрии сердечной ткани 13-дневных эмбрионов. Ув. 16 000.

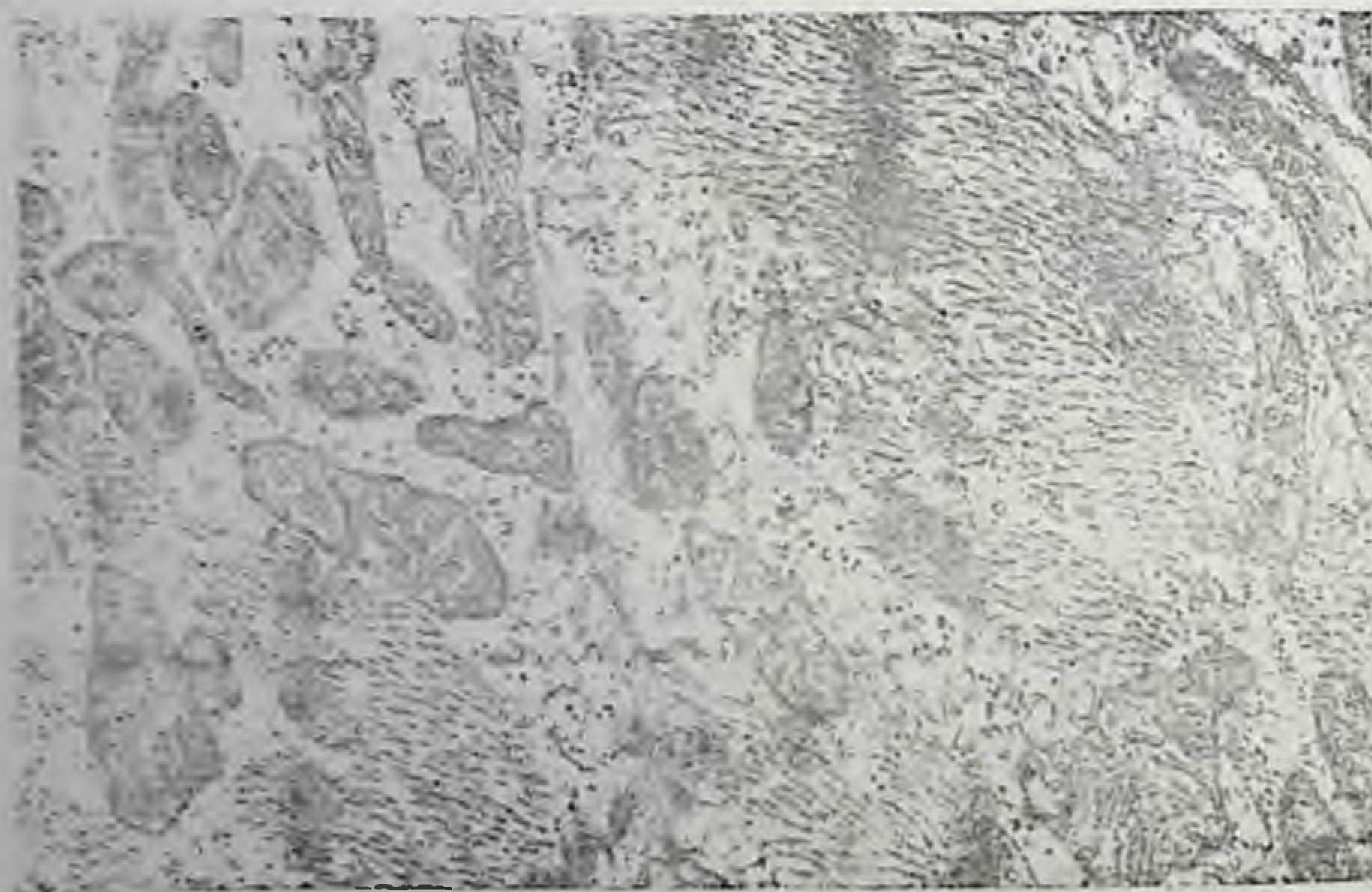


Рис. 8. Митохондрии клетки сердца 16-дневных эмбрионов. Ув. 12 000.

По ультраструктуре клетки сердечной мышцы 9-дневного эмбриона отличаются от взрослой ткани (рис. 6). Миофибриллы слабо развиты и расположены беспорядочно, в виде небольших



скоплений волокон. Между ними — митохондрии в основном овальной формы с плохо развитыми кристами, светлым матрик-



Рис. 9. Митохондрии, выделенные из ткани сердца 14-дневных эмбрионов. Ув. 16000.

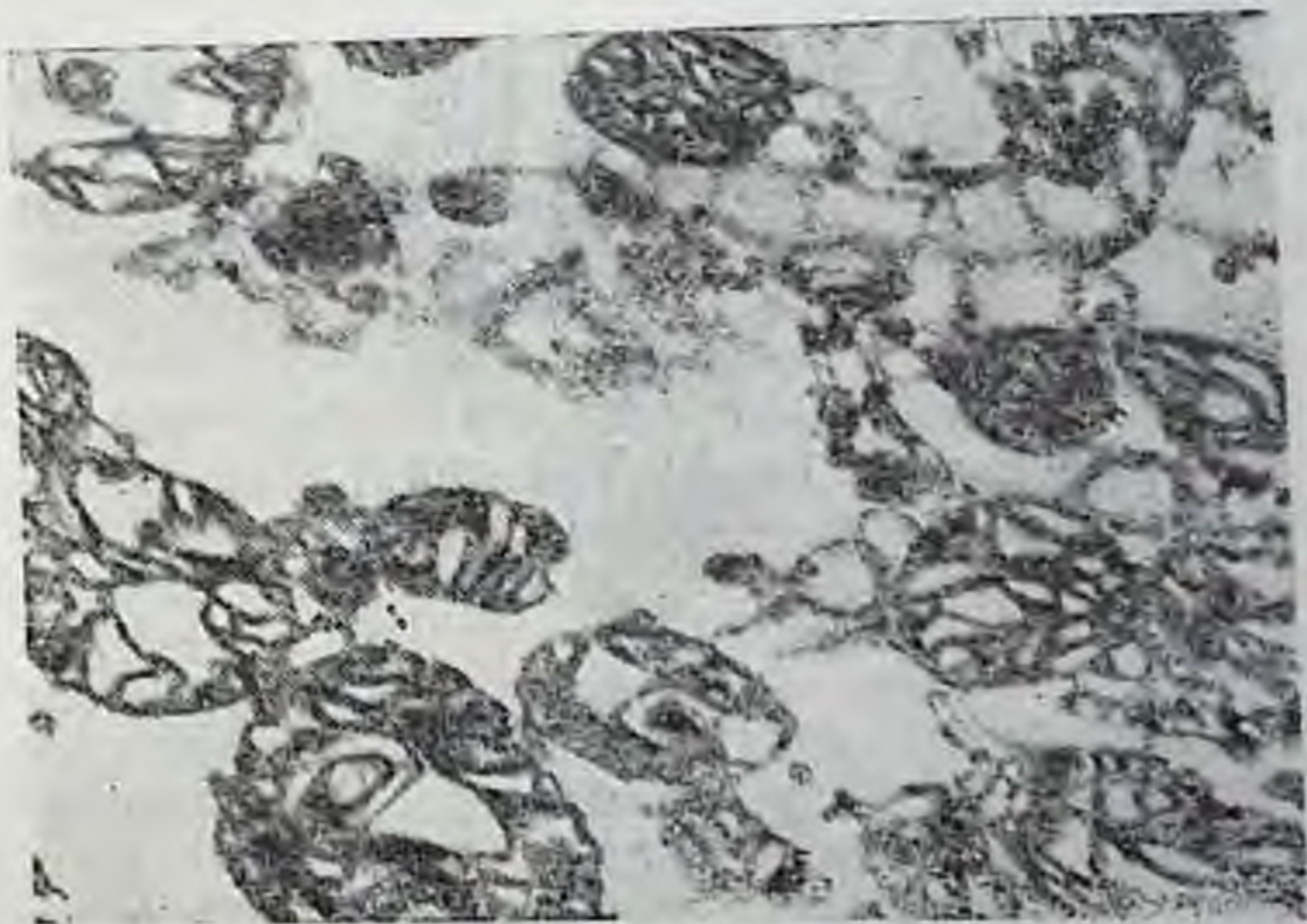


Рис. 10. Митохондрии, выделенные из сердца 19-дневных эмбрионов. Ув. 16 000.

сом и мелкозернистой структурой. У 12-дневных эмбрионов внешняя митохондриальная мембрана четко сформирована, но кристы слабо развиты и их немного (рис. 7). У 16-дневных зародышей митохондрии сердца такие же, как у взрослой сердечной ткани



(рис. 8). Форма митохондрий удлинённая, четко различимы мембраны, гранулярный матрикс, хорошо выражены кристы.

Электронно-микроскопическое исследование митохондриальной суспензии позволяет четко различать возрастные особенности структурной организации митохондрий сердца. В процессе выделения происходит сжатие матрикса и расширение внутриклеточных пространств (Бакеева и Ясайтис, 1971), что особенно хорошо выражено у 14-дневных эмбрионов (рис. 9). С увеличением возраста эмбриона митохондриальный рисунок усложняется: у 19-дневных форма митохондрий овальная, количество крист увеличено, матрикс плотный, зернистый (рис. 10).

### Развитие энергетических процессов эмбриональных митохондрий

Мы проследили развитие дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий печени и сердца куриного эмбриона на субстратах окисления, последовательно входящих в дыхательную цепь. Скорость дыхания и показатели сопряженности процессов дыхания и окислительного фосфорилирования определяли полярографически.

Как видно из рис. 11, скорость дыхания на  $\alpha$ -кетоглутарате, глутамате, сукцинате и аскорбате с ТМФД изменяется одинаково в процессе развития куриного эмбриона. Потребление кислорода митохондриями, начиная с 10-го дня развития эмбриона, постепенно увеличивается и достигает максимальных значений на 16—17-й день, затем к 18—20-му дню снижается, у однодневных цыплят резко повышается и у взрослых птиц несколько снижается.

Иную картину мы наблюдали, изучая сопряженность процессов окисления и фосфорилирования (рис. 12). Высокий дыхательный контроль отмечается на 10, 13-й дни, на 16, 17, 18-й снижается и затем вновь слегка повышается у однодневных цыплят и снижается у взрослых птиц. На кривой АДФ/О отмечается аналогичная закономерность (рис. 13).

Исследование дыхания и окислительного фосфорилирования на митохондриях сердца при окислении глутамата (рис. 14) показало, что скорость дыхания повышается к 18-му дню эмбрионального периода и у однодневных цыплят. Показатели дыхательного контроля (рис. 14) изменяется так же, как и на митохондриях печени, на 18—19-й день снижаются, а в постнатальном периоде увеличиваются. Как видно из приведенных результатов, на 16—17-й день происходит усиление дыхания, но снижение дыхательного контроля.

Известно, что в тканях с повышенной биосинтетической активностью, к которым относится эмбриональная ткань, наблюдается снижение дыхательного контроля и Р/О (Скулачев, 1962;



Кудзина и Евтодненко, 1968), что, возможно, связано с отвлечением части АТФ на биосинтетические процессы.

В. И. Махинько и В. Н. Щегольков (1974) наблюдали снижение дыхательного контроля по Чансу-Уильямсу и АДФ/О на 22-й

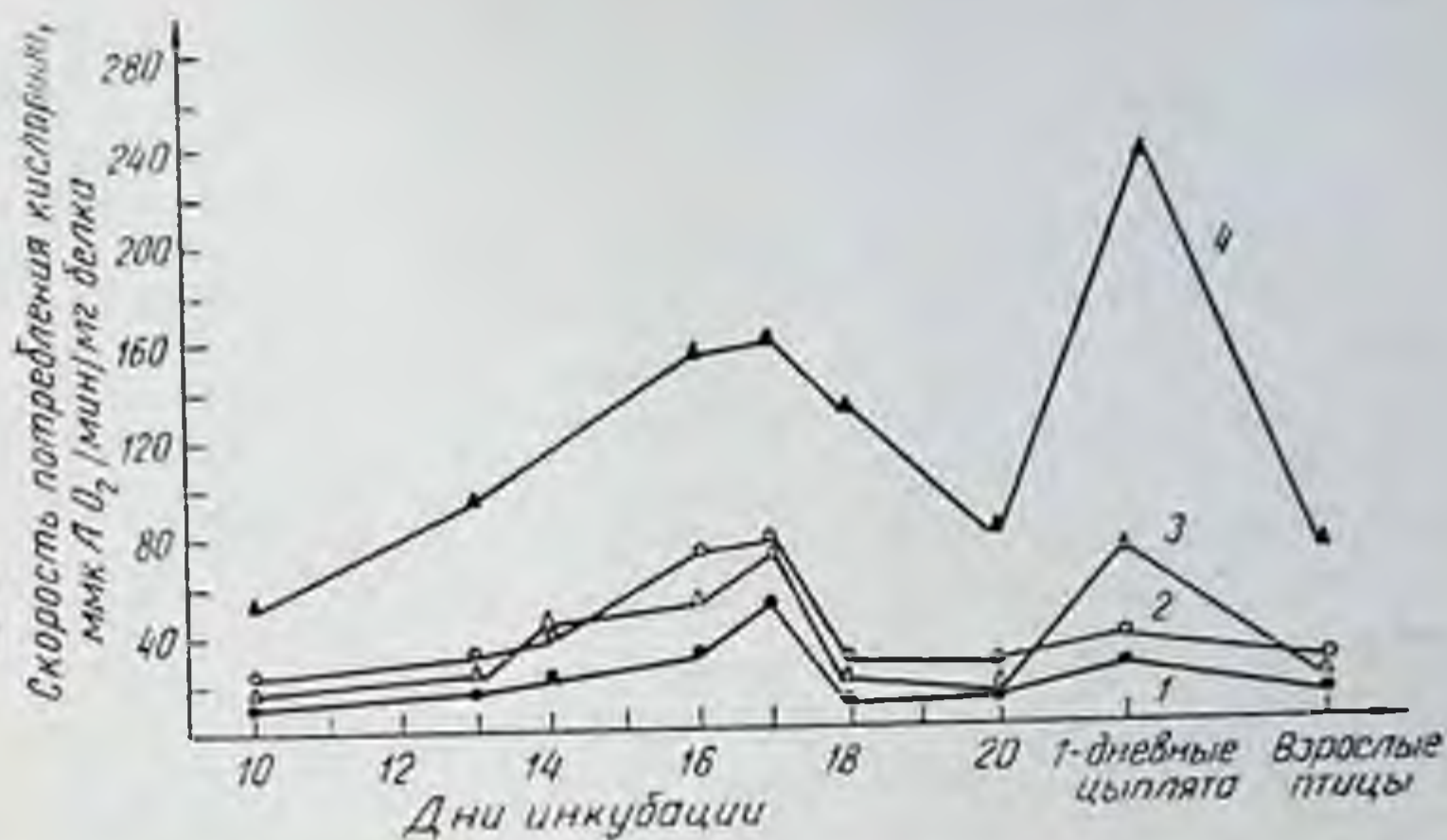


Рис. 11. Скорость дыхания митохондрий печени в пренатальном онтогенезе.

Субстраты окисления: 1—глутамат, 2—сукцинат, 3—α-кетоглутарат, 4—аскорбат+ТМФД. Те же обозначения на рис. 12, 13.

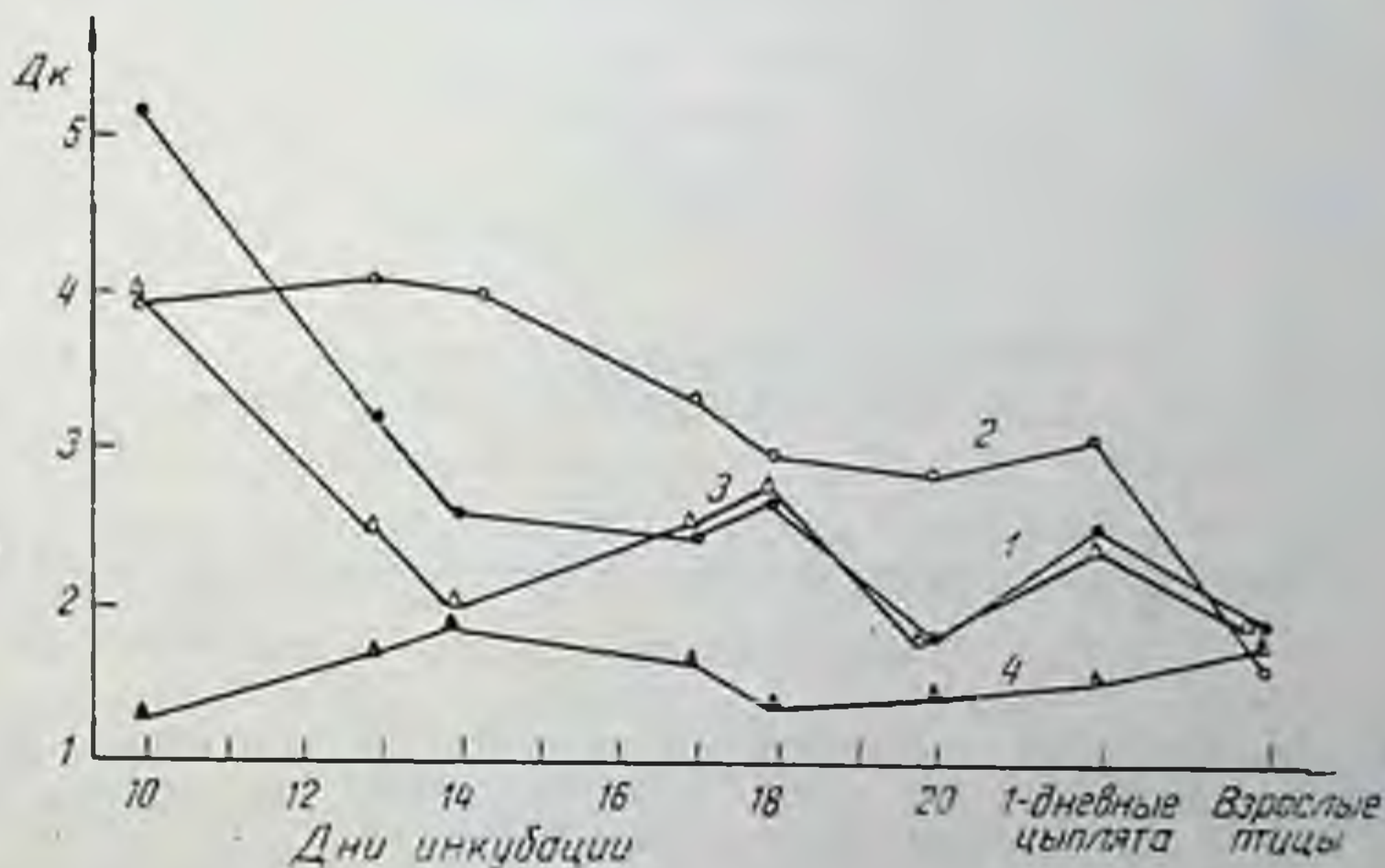


Рис. 12. Величина дыхательного контроля митохондрий печени в пренатальном онтогенезе.

день инкубации в митохондриях печени утиных эмбрионов и объясняют такое явление усилением процессов теплообразования в этот период. Наибольшие изменения концентрации органического фосфата и нуклеотидов в сердечной мышце эмбрионов кур происходят между 12-м и 20-м днями инкубации (Radha and



Krishnamoorthy, 1973). Наблюдается уменьшение содержания соединений АТФ и неорганического фосфата и увеличение концентрации АДФ и отношения АДФ/АТФ, что связано, по мнению

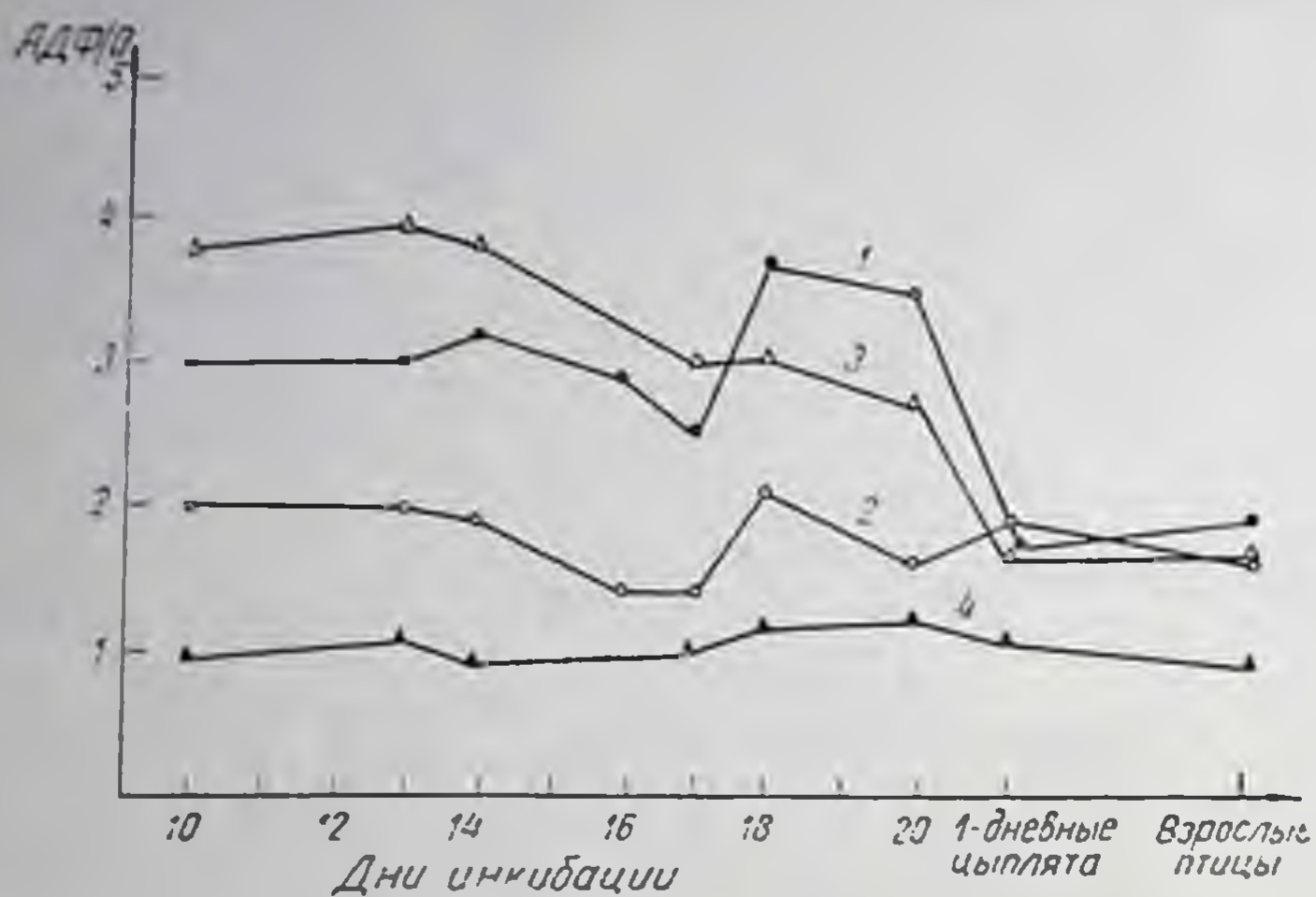


Рис. 13. Коэффициент АДФ/О митохондрий печени в пренатальном онтогенезе.

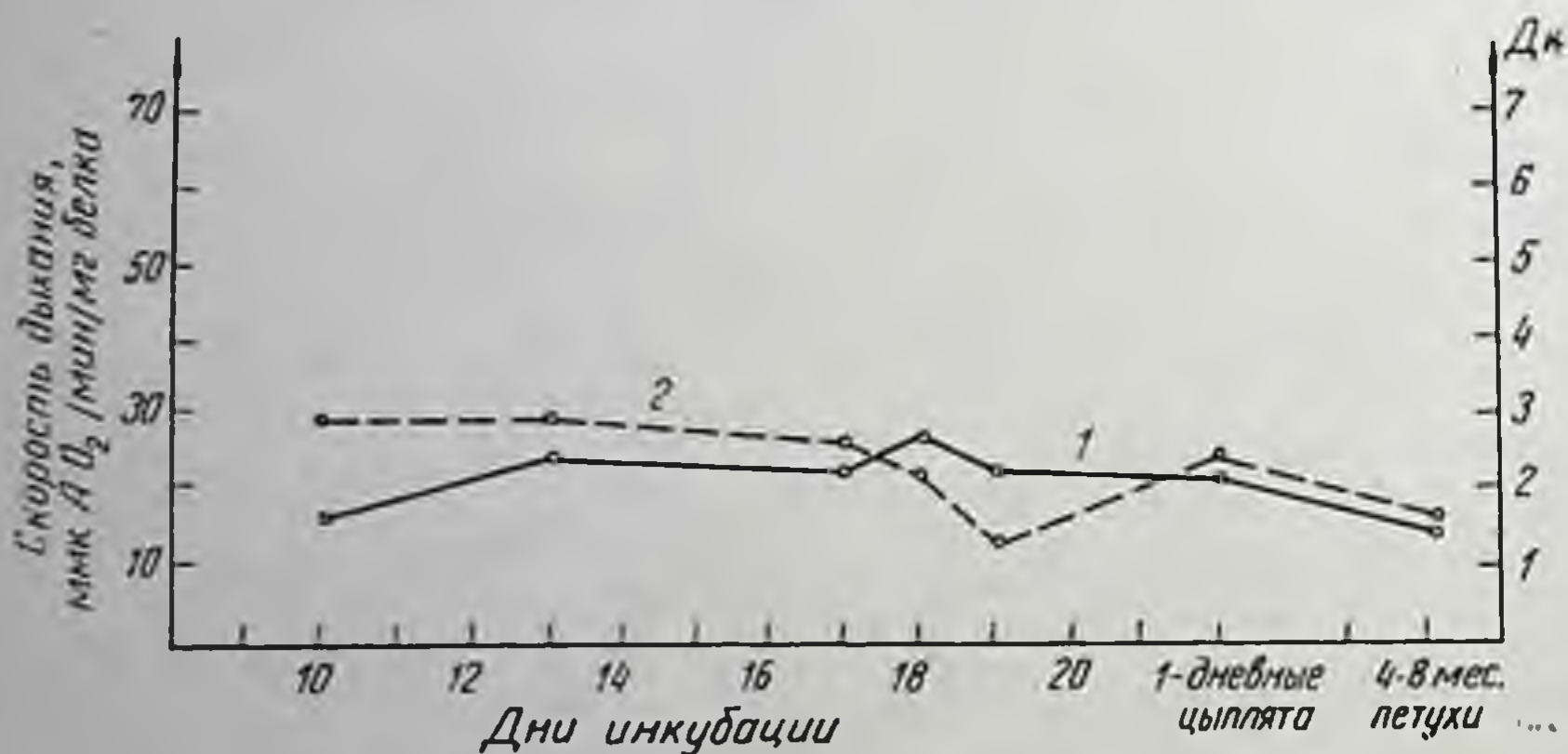


Рис. 14. Скорость дыхания (1) и величина дыхательного контроля (2) митохондрий сердца в пренатальном онтогенезе. Субстрат окисления — глутамат.

авторов, с активированием реакции трансфосфорилирования и возрастанием сократительной активности мышц.

Если в раннем эмбриональном периоде развития птиц и млекопитающих мышечная ткань обладает повышенной способностью к использованию глюкозы и высокой гексокиназной активностью, то примерно с 17-го дня происходит переход к гликогенолизу и в соответствии с этим увеличивается фосфорилазная активность (Перцева и Желудкова, 1969), что объясняется интенсификацией



окислительно-восстановительных и биосинтетических процессов. Одновременно усиливается образование гепатоцитов, функциональное созревание мышечной ткани, формирование сложных специализированных реакций (Greengard, 1973). Гликоген, накопленный клетками к 16—17-му дню интенсивно расходуется, что сопровождается повышением содержания лактата в печени (Перцева, 1961). Однако гликолиз в полной мере не обеспечивает клетку энергией, поэтому происходит отмеченное выше снижение содержания АТФ.

В коренных изменениях метаболизма эмбриональных тканей важная роль принадлежит гормональным факторам, основным регуляторам обменных процессов. В этот период отмечается функциональное созревание всех эндокринных органов (Рольник, 1968) и связанное с ним выделение гормонов в кровь, использование их тканями, а главное, ответная реакция тканей на гормон (Лейбсон, Плисецкая, 1961, 1963).

Как указывалось выше, к 15-му дню развития отмечается полноценное функционирование щитовидной железы, которая включается в регуляцию окислительно-восстановительных процессов (Romijan et al., 1952).

А. Ф. Головачев и Е. А. Надальяк (1970, 1973) нашли, что в печени 13—14-дневных куриных эмбрионов концентрация свободных радикалов такая же, как у 20-дневных цыплят. Начиная с 15-го дня эмбрионального развития их концентрация уменьшается до момента вылупления, а затем возвращается к исходной. Содержание свободных радикалов является показателем интенсивности окислительно-восстановительных процессов и параллельно увеличению дыхания, сукциноксидазной активности, увеличению популяции митохондрий (Van Rossum, 1963; Minz et al., 1967).

Повышение концентрации свободных радикалов в ткани печени на 12—13-й день инкубации зародышей некоторые авторы связывают с интенсификацией функциональной активности тиреоидной паренхимы (Огородникова, 1969; Газдаров и др., 1970).

Отмеченный в наших исследованиях высокий уровень окислительного фосфорилирования в ткани печени и сердца на 10—13-й день развития эмбриона, возможно, объясняется началом включения гормонов щитовидной железы в регуляцию энергетических процессов в митохондриях эмбриональных тканей, так как к этому периоду заканчивается формирование фолликулов, начинает вырабатываться гормон и, по-видимому, минимальное его количество поступает в кровь.

М. С. Мицкевич (1966) указывает, что 13-й день развития является началом гормональной регуляции углеводного обмена у куриных эмбрионов. С увеличением срока инкубации, как показали наши исследования, кривая поглощения  $J^{131}$  щитовидной железой куриных эмбрионов быстро растет, усиливается секреция и поступление гормонов в ткани эмбриона.



Скорость потребления кислорода митохондриями печени усиливается и на 16—17-день достигает максимума. Причина заключается в повышении метаболической активности эмбриональных тканей, усилении биосинтетической деятельности печени. Наряду с интенсивным делением клеток происходит увеличение количества в них митохондрий, о чем свидетельствует и электронно-микроскопическое исследование. В этот период форма митохондрий разнообразна, много удлинённых, гантелевидных делящихся митохондрий. По-видимому, замещение удлинённых нитевидных митохондрий округлыми происходит путем фрагментации удлинённых форм.

Снижение дыхательного контроля и коэффициента АДФ/О происходит за счет увеличения доли свободного окисления (Скулачев, 1962). Разобщение процессов дыхания и фосфорилирования обусловлено накоплением большого количества липидов и какого-то сопутствующего им пигмента, резко меняющего цвет печени (Головачев и Надальяк, 1973).

А. А. Симонян (1969) выделил из печени куриного эмбриона липопротеиновую фракцию, которая обнаруживается с 16—17-го дня и значительно увеличивается на 19—21-й день инкубации. Под действием этой фракции процесс окислительного фосфорилирования в митохондриях разобщается не только в печени, но и в других органах. На 18—19-й день происходит резкое снижение скорости дыхания в печени наряду со снижением дыхательного контроля и Р/О.

В митохондриях сердца скорость дыхания почти не меняется; это, по-видимому, связано с функциональной особенностью сердечной мышцы, которая даже в эмбриональный период, в отличие от других органов, активно функционирует и нуждается в больших количествах кислорода. Однако дыхательный контроль снижается к концу эмбрионального периода. В это время уменьшается концентрация свободных радикалов, отражающая, по-видимому, степень отрегулированности дыхательной цепи. Уменьшение потребления кислорода у 18—20-дневных эмбрионов до уровня 10-дневных можно объяснить частичным снижением активности щитовидной железы к концу эмбрионального развития кур (Мицкевич, 1966), что, возможно, связано с деятельностью гипофиза, так как в этот период начинает активно функционировать система гипофиз — щитовидная железа (Студитский, 1947; Мицкевич, 1957). Кроме того, причина замедления дыхания может заключаться в коренной перестройке организма птицы в связи с переходом от аллантаоисного дыхания к легочному и включением малого круга кровообращения перед вылуплением цыпленка (Рольник, 1968).

Высокий уровень дыхания митохондрий у однодневных цыплят в наших исследованиях, вероятно, связан с повышением интенсивности окислительных процессов в тканях и органах новорожденных птиц (Смолянников и Розгони, 1971). В то же время



у взрослых кур низкий уровень потребления кислорода митохондриями печени, по-видимому, обусловлен снижением интенсивности окислительной активности митохондрий печени, связанным с завершением бурного роста организма (Вильнер, 1970), и снижением активности щитовидной железы.

Из представленных данных следует, что окислительные процессы в изолированных митохондриях печени и сердца имеют ряд особенностей. На ранних стадиях становления щитовидной железы отмечается большая сопряженность процессов дыхания и окислительного фосфорилирования, характеризующаяся высоким дыхательным контролем и P/O. На 16—17-й день развития эмбриона отмечается разобщенность окисления и фосфорилирования, объясняющаяся усилением митотической и биосинтетической активности эмбриональных тканей, а также усилением деятельности щитовидной железы и других желез внутренней секреции. Морфологические данные строения митохондрий характеризуют их функциональное состояние. Перед вылуплением цыпленка окислительные процессы в митохондриях понижаются. Для сердца характерна относительная стабильность дыхания митохондрий в течение пренатального развития.

#### СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ МИТОХОНДРИЙ ПОД ВЛИЯНИЕМ ТИРОКСИНА В ПРЕ- И ПОСТНАТАЛЬНЫЕ ПЕРИОДЫ

В зависимости от содержания гормона в организме изменяется структура митохондрий (Туракулов, 1972). В этом отношении значительный интерес представляет влияние тироксина на структуру митохондрий органов развивающегося организма, так как эмбриональная ткань отличается пониженной чувствительностью к тироксину (Хамидов, 1972). Наиболее достоверным методом исследования является прижизненная электронно-микроскопическая регистрация структуры митохондрий *in situ* (Ясайтис и Бакеева, 1972). В наших исследованиях представлен анализ структурных изменений митохондрий *in situ* эмбриональных органов (сердце, печень, мозг), происходящих в ответ на введение тироксина *in vivo*.

Опыты проведены на куриных эмбрионах различных сроков развития и 3-дневных цыплятах. За 3 дня до забоя в яйцо однократно вводили тироксин в дозе 0,015; 1; 4 и 15  $\mu$ .

Электронно-микроскопическая характеристика структуры митохондрий сердца и печени у нормально развивающихся куриных эмбрионов представлена в первой части наших исследований.

На рис. 15 показана электронограмма клеток сердечной мышцы 9-дневного куриного эмбриона при введении в яйцо тироксина в дозе 0,015  $\mu$ . Ультраструктура клеток миокарда существенно изменяется. Мышечные волокна развиты и принимают характерное



поперечно-полосатое строение, между ними располагаются митохондрии, почти все удлиненной формы, количество крист увели-

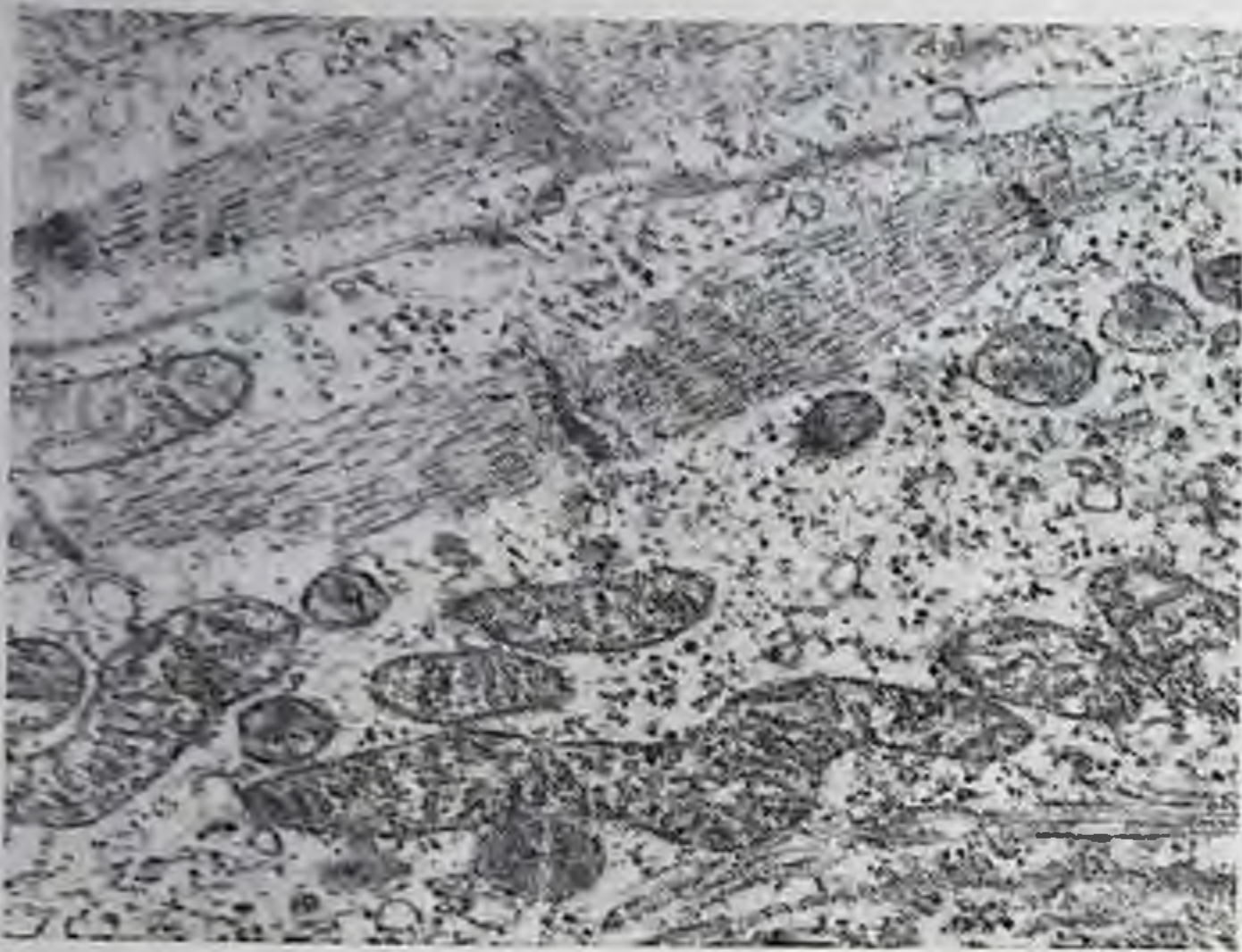


Рис. 15. Митохондрии сердечной ткани 9-дневного эмбриона после введения 0,015  $\mu$  тироксина. Ув. 15000.

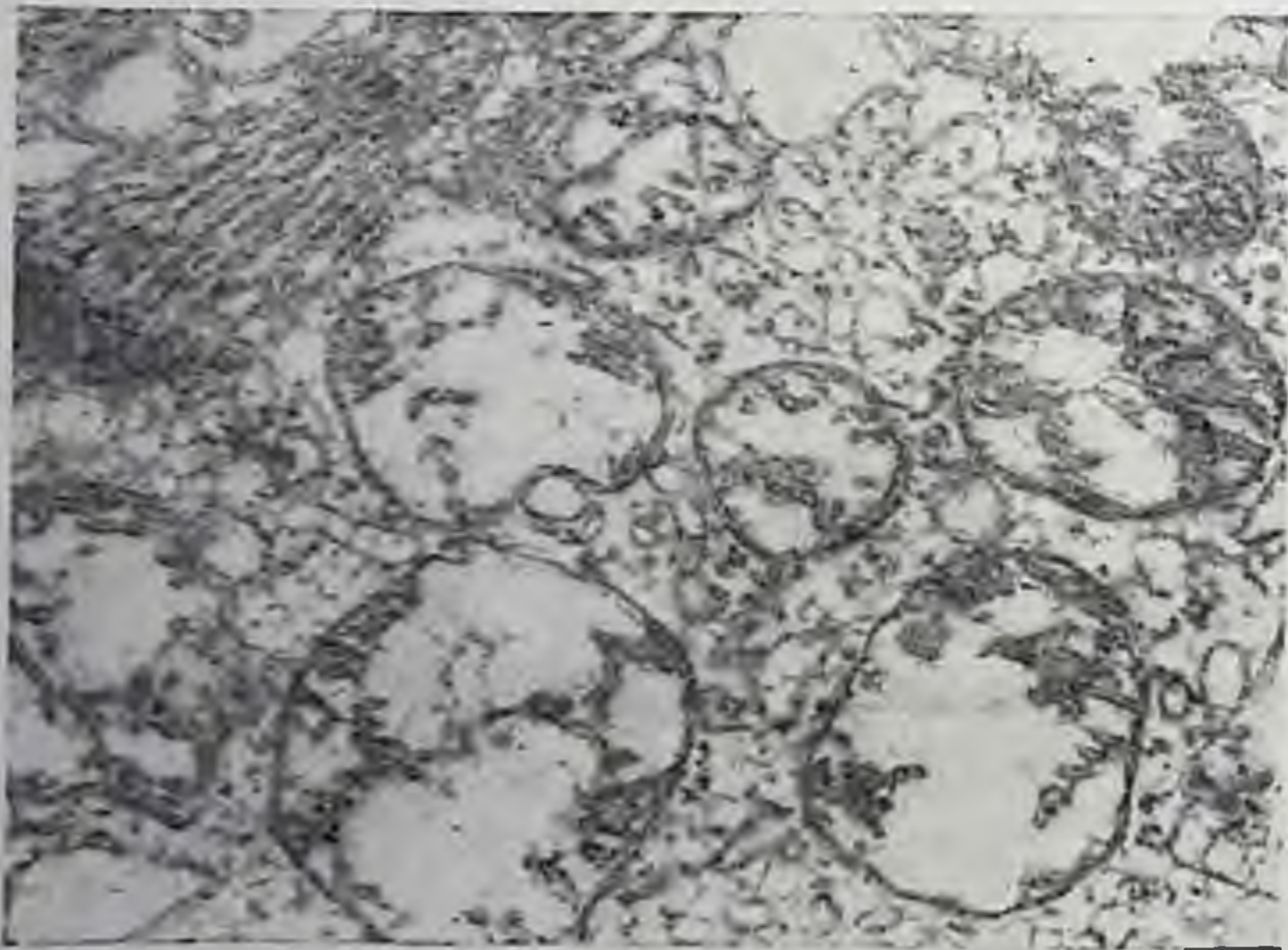


Рис. 16. Митохондрии сердца 9-дневных эмбрионов после введения 4  $\mu$  тироксина. Ув. 20000.

чивается. Кристы расположены по отношению к длине оси митохондрий поперечно и заполняют почти всю их полость. Так как в этот период кристы неглубокие, то, возможно, принятие мито-



хондриями удлиненной формы способствует компактной упаковке крист, увеличению внутренней поверхности мембран и сжатию матрикса. Матрикс становится более плотным, зернистость увеличивается. Такая организация митохондриальной структуры характерна для усиленно функционирующих митохондрий (Tata, 1964; Бакеева и Ясайтис, 1972) в условиях активного транспорта катионов и анионов.

При введении 9-дневным эмбрионам 4  $\mu$  тироксина (рис. 16) наблюдается вакуолярное просветление матрикса, характерное для набухших митохондрий.

На 16—17-й дни развития введение 4  $\mu$  тироксина вызывает яркий анаболический эффект. Форма митохондрий становится удлиненной, некоторые приобретают причудливые очертания (рис. 17). Увеличивается число перпендикулярно расположенных крист, которые плотно заполняют внутренность органоида, межмембранное пространство уменьшается и уплотняется. Применение высоких доз тироксина (15  $\mu$ ) у 16-дневных эмбрионов и 3-дневных цыплят не вызывает выраженных структурных изменений митохондрий сердца (рис. 18), тогда как на печени 16-дневных эмбрионов токсическое действие тироксина проявляется ярко (рис. 19). Все митохондрии сильно увеличены в размере, форма круглая, кристы редуцированы.

По мнению ряда исследователей (Tata, 1963, 1964; Roodyn et al., 1965; Gustafsson et al., 1965), физиологическая роль гормонов щитовидной железы заключается в контроле метаболической активности путем изменения тонкой структуры митохондрий, связанного с дыханием и окислительным фосфорилированием.

Работы лаборатории А. Ленинджера (1966) показали, что тироксин вызывает набухание митохондрий печени *in vitro*.

R. Gustafsson et al. (1965) на скелетной мышце исследовал тонкую структуру митохондрий после тиреоидэктомии и лечения тироксином. Было отмечено своеобразное изменение митохондрий: увеличение общей величины в 1,5 раза при тиреоидэктомии и от 2,5 до 3,5 раза при введении тироксина по сравнению с контрольными животными. Отношение объема крист к матриксу также повышается, происходит расширение внутреннего пространства крист, митохондрии приобретают удлиненную форму. Такая реакция на введение гормона является характерной для мышечной ткани, в отличие от печени.

Исследователи объясняют одинаковую реакцию митохондрий на пониженное и повышенное количество гормонов тем, что при гипотиреозе происходит компенсаторное возрастание величины митохондрий, в то время как при гиперметаболизме наблюдается увеличение количества митохондриального белка (Lagdy et al., 1960; Maugy, Sgane, 1964). Гипертрофия более заметна в перенуклеарной и субсарколемной областях вблизи от кровеносных сосудов.



В наших исследованиях в ранние и поздние сроки развития у эмбрионов при введении тироксина происходит прогрессивное

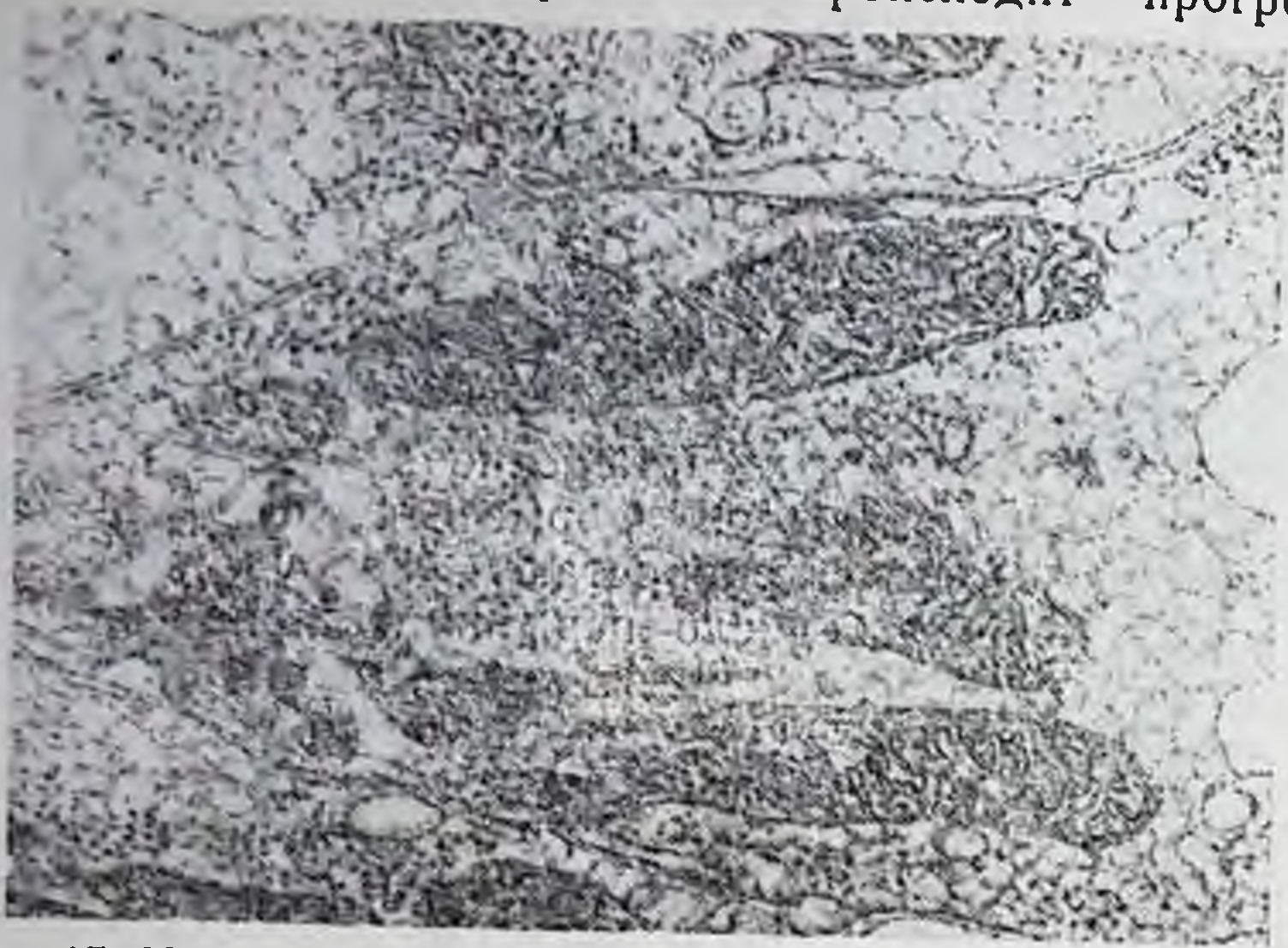


Рис. 17. Митохондрии сердца 17-дневных эмбрионов после введения 4γ тироксина. Ув. 12000.

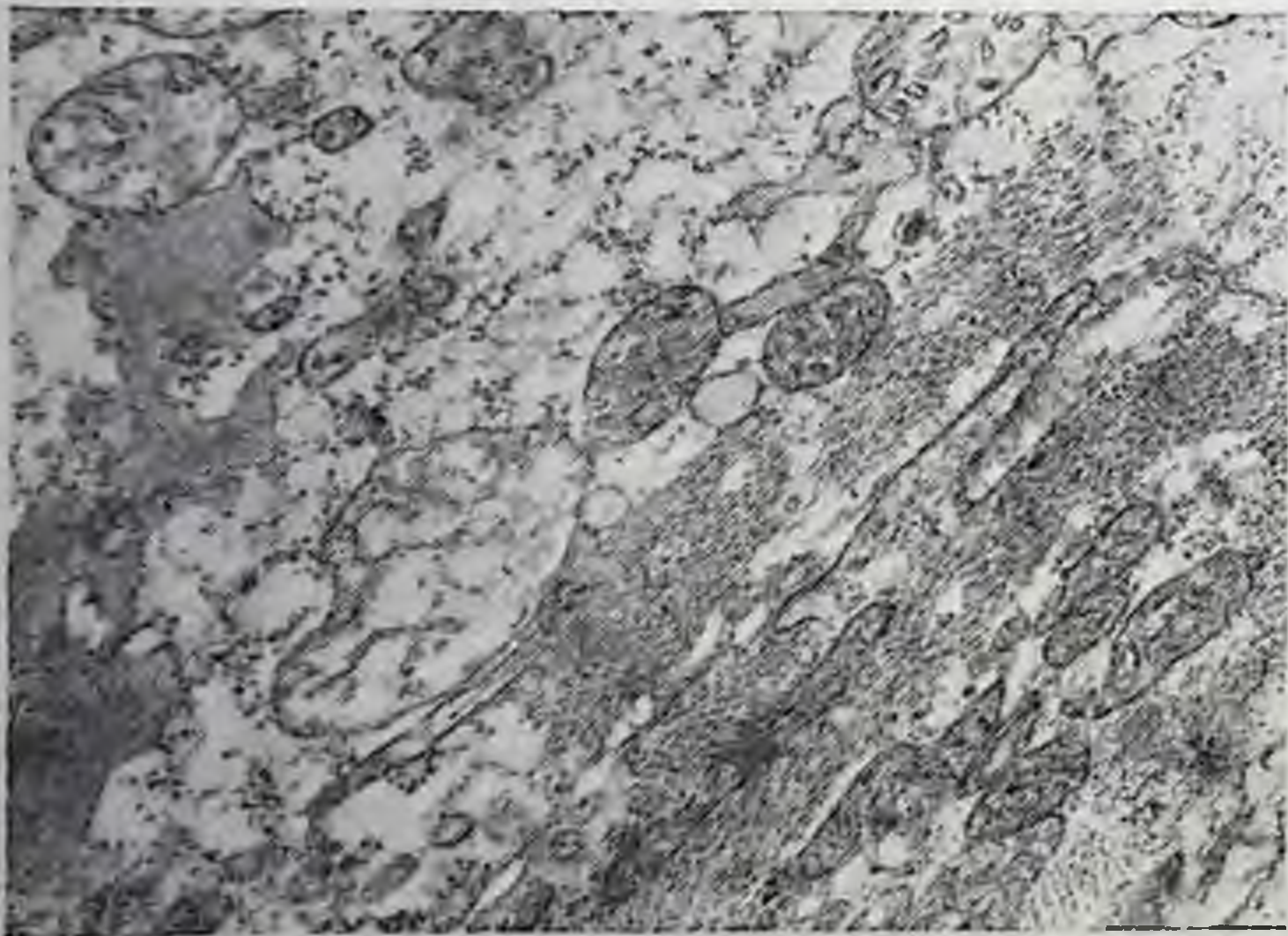


Рис. 18. Митохондрии сердца 16-дневных эмбрионов после введения 15γ тироксина. Ув. 10000.

увеличение количества и изменение структуры митохондриальных крист.

Исследования на эндоплазматическом ретикулуме показали, что увеличение количества мембранных структур — характерное проявление физиологического действия тироксина на рост и раз-



витне и является результатом усиления биогенеза митохондрий (Freeman et al., 1963; Bronk, 1963; Tata, 1971).

Известно, что тиреоидные гормоны повышают митоз клеток. В развивающемся организме с повышенной митотической активностью действие тироксина проявляется в еще более активном делении клеток (Balazs, 1971). При гипертиреозе количество митохондрий в клетке увеличивается, т. е. тироксин способствует делению митохондрий. В мышце сердца на 9 и 16-й дни инкубации митохондрии после введения тироксина удлиняются, некоторые принимают причудливые удлиненные и гантелеобразные формы с концентрически-поперечным расположением крист гантелеоб-



Рис. 19. Митохондрии печени 16-дневных эмбрионов после введения 15γ тироксина. Ув. 12 000.

разной формы. Такое изменение формы митохондрий указывает на начало их деления (Ленинджер, 1966). Можно предположить, что тироксин способствует делению митохондрий и увеличению их количества.

Характер строения митохондрий в целом, также как и ультраструктура матрикса и крист, тесно связан с их функциональным состоянием (Митюшин, 1969; Бакеев и Ясайтис, 1972). Огрубление и уплотнение матрикса соответствуют состоянию прочного сопряжения.

С. Р. Наскенброк (1968), описывая ультраструктурные переформировки митохондрий, отметил, что состояние 3 (по Чансу) является высокоэнергизированным, митохондрии принимают «сокращенную» форму в результате сжатия матрикса и распрямления крист, которые глубоко вдаются в матрикс. В противоречии с этими данными находятся наблюдения Р. Buffa et al., (1970), установивших, что при действии различных разобщителей окис-



лительного фосфорилирования на культуру фибробластов сердца куриного эмбриона *in situ* происходит удлинение формы и сжатие матрикса, как в состоянии 3 (по Чансу).

По наблюдениям ряда авторов, овальная, удлиненная и палочкообразная формы свойственны функционально активным митохондриям (Саркисов и Втюрин, 1967).

При применении больших доз гормона у 9-дневных эмбрионов ультраструктура митохондрий сердца имеет иное строение: светлые промежутки резко увеличиваются в размере, приобретают вид вакуолей, митохондрии становятся овальными что говорит о состоянии «рыхлого сопряжения» (Козырева и Митюшин, 1971) и разобщении процессов дыхания и фосфорилирования.

У 16-дневных эмбрионов картина иная: только часть митохондрий находится в состоянии «рыхлого сопряжения», остальные сохраняют обычную структуру, свойственную нормальному состоянию.

Некоторые исследования (Green and Fleischer, 1960) на сердце крыс показали устойчивость митохондрий сердца к действию повреждающих агентов и независимость процесса фосфорилирования от набухания митохондрий (Smith et al., 1963). П. М. Самойлов (1963) наблюдал нарушение фосфорилирования в изолированных митохондриях сердца только при крайней степени тиреотоксикоза.

В отличие от сердца, митохондрии печени при дозе 15 $\gamma$  резко увеличиваются в размере, кристы редуцируются. Подобная картина наблюдается при действии больших количеств тироксина *in vitro*, когда процесс фосфорилирования полностью разобщен (Туракулов, 1973). Однако на 9—10-й день развития почти отсутствует реакция изменения структуры митохондрий печени на введение гормона. В раннем онтогенезе митохондрии печени не способны полностью осуществлять циклы набухания — сокращение (Minz et al., 1967; Ластовская, 1969).

Митохондрии мозга 9-дневных эмбрионов плохо развиты: небольшого размера, овальной формы, хорошо видна внутренняя и наружная мембрана; кристы также плохо развиты, матрикс электронно-оптически плотный, местами видна мелкозернистая исчерченность. При введении тироксина в дозе 0,015 $\gamma$ , 1 $\gamma$  видимых изменений в структуре митохондрий обнаружить не удалось (рис. 20).

В поздние сроки развития (16—17-й день) митохондрии мозга имеют светлый матрикс и малое количество крист. В этот период, также как и в ранний период эмбриогенеза, при введении физиологических и токсических количеств тироксина не происходит каких-либо структурных изменений митохондрий (рис. 21).

У 3-дневных цыплят ультраструктурная картина клеток отличается от эмбриональной (рис. 22): клетки мозга более дифференцированы, органеллы хорошо развиты, митохондрии овальной и эллипсоидной формы с четкой двуслойной мембраной, боль-



шое количество крист плотно заполняет внутренность митохондрий, матрикс темный, хорошо видна крупнозернистая поперечность. После введения 15 $\mu$  тироксина митохондрии увеличи-

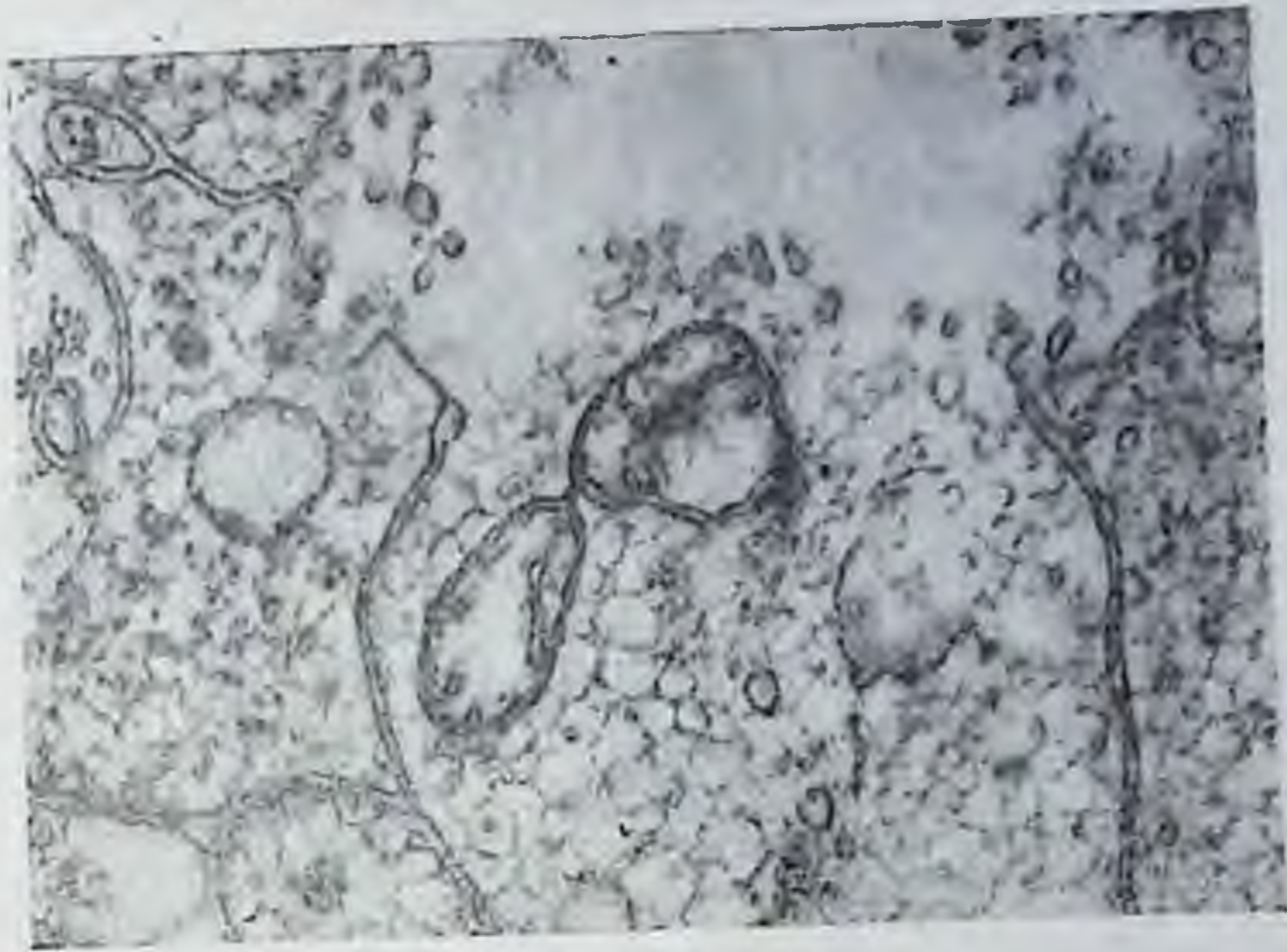


Рис. 20. Митохондрии мозга 9-дневных эмбрионов после введения 15 $\mu$  тироксина. Ув. 16000.



Рис. 21. Митохондрии мозга 16-дневных эмбрионов после введения 4 $\mu$  тироксина. Ув. 18000.

ваются в размере, крист становится значительно меньше, ясно видны очаговые просветления матрикса (рис. 23). Указанные изменения сходны с картиной набухания митохондрий печени при тиреотоксикозе (Туракулов, 1970).



Таким образом, митохондрии мозга в пренатальный период развития в структурном отношении резистентны как к малым, так и к токсическим дозам гормона. Начиная с первых дней пост-



Рис. 22. Митохондрии мозга 3-дневных цыплят. Ув. 20000

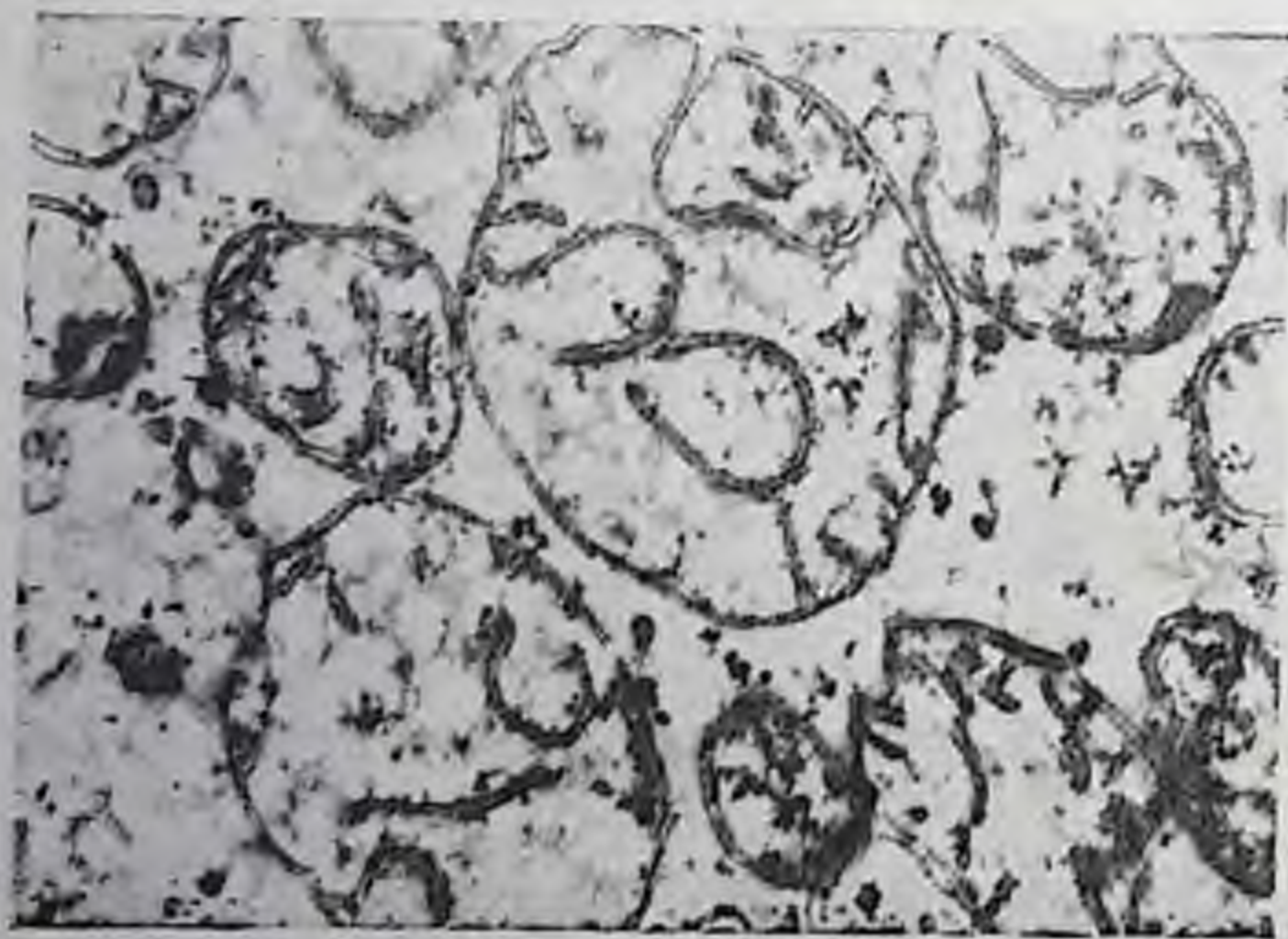


Рис. 23. Митохондрии мозга 3-дневных цыплят после введения 15γ тироксина. Ув. 49000.

натальной жизни проявляется действие тироксина и можно наблюдать характерные изменения структуры митохондрий.

В отличие от печени и сердца структура митохондрий мозга в течение эмбрионального периода резко не изменяется. Лишь



после вылупления отмечаются возрастные различия структуры митохондрий. По наблюдениям многих исследователей (Namburgh, 1966; Scharigo, 1968), дифференцировка и развитие центральной нервной системы происходят в постнатальный период. С этим связано и усиление метаболических процессов в ткани мозга, биохимическая дифференцировка митохондрий, изменение качественного и количественного состава белков и липидов мембран митохондрий (Waehpeld et al., 1969), увеличение их проницаемости (Абрамова, 1973).

Р. Gordon (1961), оценивая изменения оптической плотности суспензии митохондрий мозга новорожденных и взрослых крыс при изменении осмотического давления и введении тироксина, показал, что этот феномен наиболее отчетливо проявляется в 1—4-й дни постнатальной жизни. Это подтверждается также нашими экспериментами.

Анализируя результаты исследований действия тироксина на структуру митохондрий *in situ*, можно сделать вывод, что под влиянием тироксина структурная организация митохондрий сердца изменяется в ранние и поздние сроки развития эмбриона. Ультраструктурные изменения крист, матрикса и формы митохондрий свидетельствуют о стимуляции ее функциональной активности. Набухание митохондрий при введении токсических доз гормона проявляется сильнее всего на митохондриях печени в поздние сроки эмбрионального развития. Митохондрии мозга в пренатальный период онтогенеза в структурном отношении резистентны к тироксину, реакция мозга на тироксин проявляется только в постнатальный период.

### **ВЛИЯНИЕ ТИРОКСИНА НА ДЫХАНИЕ И ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ МИТОХОНДРИЙ СЕРДЦА И ПЕЧЕНИ**

Тиреоидные гормоны при введении животным нарушают механизм энергетического сопряжения. Изучение процесса окислительного фосфорилирования на изолированных митохондриях показало, что происходит типичный феномен разобщения — снижение дыхательного контроля и выработки АТФ. Тиреоидные гормоны, добавленные *in vitro* непосредственно к митохондриям, выделенным из ткани нормальных животных, вызывают изменения их функций, характерные для разобщения (Скулачев, 1962; Рачев, 1969; Туракулов, 1970). Наблюдается как полное, так и частичное разобщение (Гагельганс, 1972).

В опытах Р. Р. Рачева (1969) показана различная чувствительность отдельных участков дыхательной цепи к действию тиреоидных гормонов. Указанные эффекты происходят при «токсическом» действии тироксина; введение же небольших, «физиологических» доз приводит к стимуляции электронного транспорта,



фосфорилирующей системы, повышает общий метаболизм (Вгонк, 1962, 1963, 1963а).

Исследования J. R. Tata (1970) показывают, что стимулирующее действие тиреоидных гормонов на клеточные процессы связано с усилением синтеза новых дыхательных ферментов и синтеза белка как в микросомах, так и в митохондриях (Rabinowitz, Swift, 1970; Gross, 1971).

Гормональная регуляция энергетических процессов в тканях развивающегося организма изучена слабо. Выше говорилось о роли гормонов щитовидной железы в процессах роста и морфофункциональной дифференцировки органов в ходе эмбрионального и постэмбрионального развития. Это обуславливает некоторые особенности действия тироксина и трийодтиронина на энергетику клетки (Balazs, 1971; Хамидов, 1972). Несомненно, что регуляторная функция тиреоидных гормонов в митохондриях зависит от их морфохимической зрелости и формируется в онтогенезе во время становления специфических функций.

Многие вопросы изменения интенсивности дыхания, окислительного фосфорилирования, величины дыхательного контроля и отношения Р/О под влиянием тиреоидных гормонов в эмбриогенезе остаются невыясненными.

### Влияние тироксина *in vitro*

Экспериментальные исследования проводили на выделенной фракции митохондрий печени и сердца куриных эмбрионов различного возраста. Действие гормонов анализировали полярографическим методом, измеряли скорость дыхания при окислении различных субстратов в присутствии  $P_n$  и КСI в состоянии 3 (при добавлении АДФ) и в состоянии 4 (после завершения фосфорилирования АДФ). Дыхательный контроль проводили по Чансу.

Для определения чувствительности отдельных звеньев дыхательной цепи к разобщающему действию тироксина использовали субстраты, входящие в дыхательную цепь на различных участках (глутамат, сукцинат, аскорбат с носителем ТМФД). Действие тиреоидного гормона на энергетический обмен наблюдали, добавляя L-тироксин ( $1 \cdot 10^{-8}$ — $5 \cdot 10^{-4}$  М) непосредственно в ячейку во время определения дыхания митохондрий.

Основные данные по действию тироксина *in vitro* на функцию митохондрий получены при испытании высоких доз ( $1 \cdot 10^{-5}$ — $1 \cdot 10^{-4}$  М), низкие дозы были не эффективны (рис. 24).

Результаты изучения действия токсических доз показывают, что тиреоидные гормоны вызывают как полное, так и частичное разобщение окисления и фосфорилирования. Применение различных субстратов окисления показало избирательность действия гормона. Наиболее уязвимым в этом отношении является окисление глутамата, входящего в дыхательную цепь между НАД и ФАД, так как полное разобщение окисления и фосфорилиро-



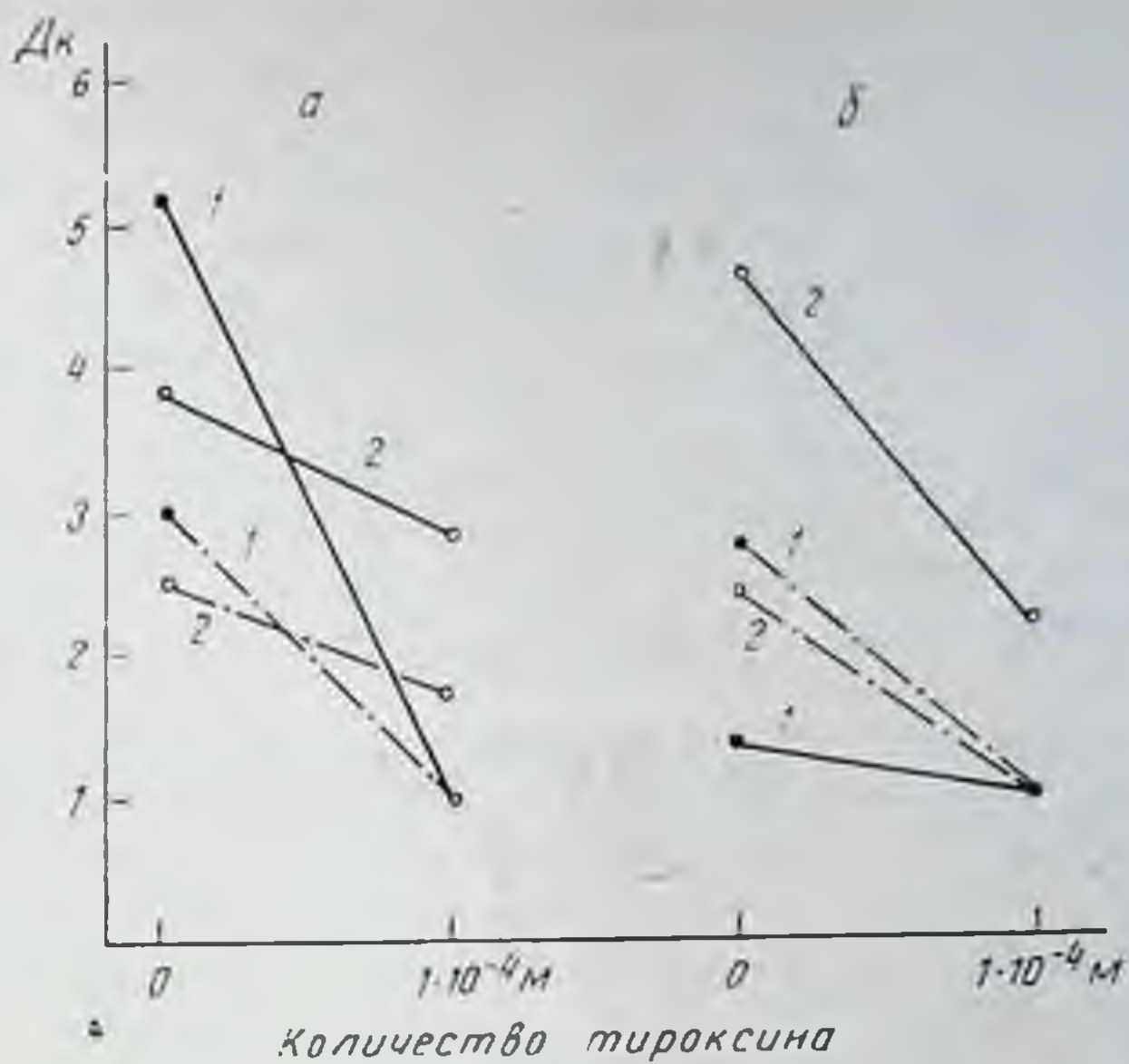


Рис. 24. Изменение дыхательного контроля митохондрий при действии больших доз тироксина *In vitro*.

Прямая линия—печень, пунктирная—сердце; а—10-дневные эмбрионы, б—16-дневные; 1—глутамат; 2—сукцинат.

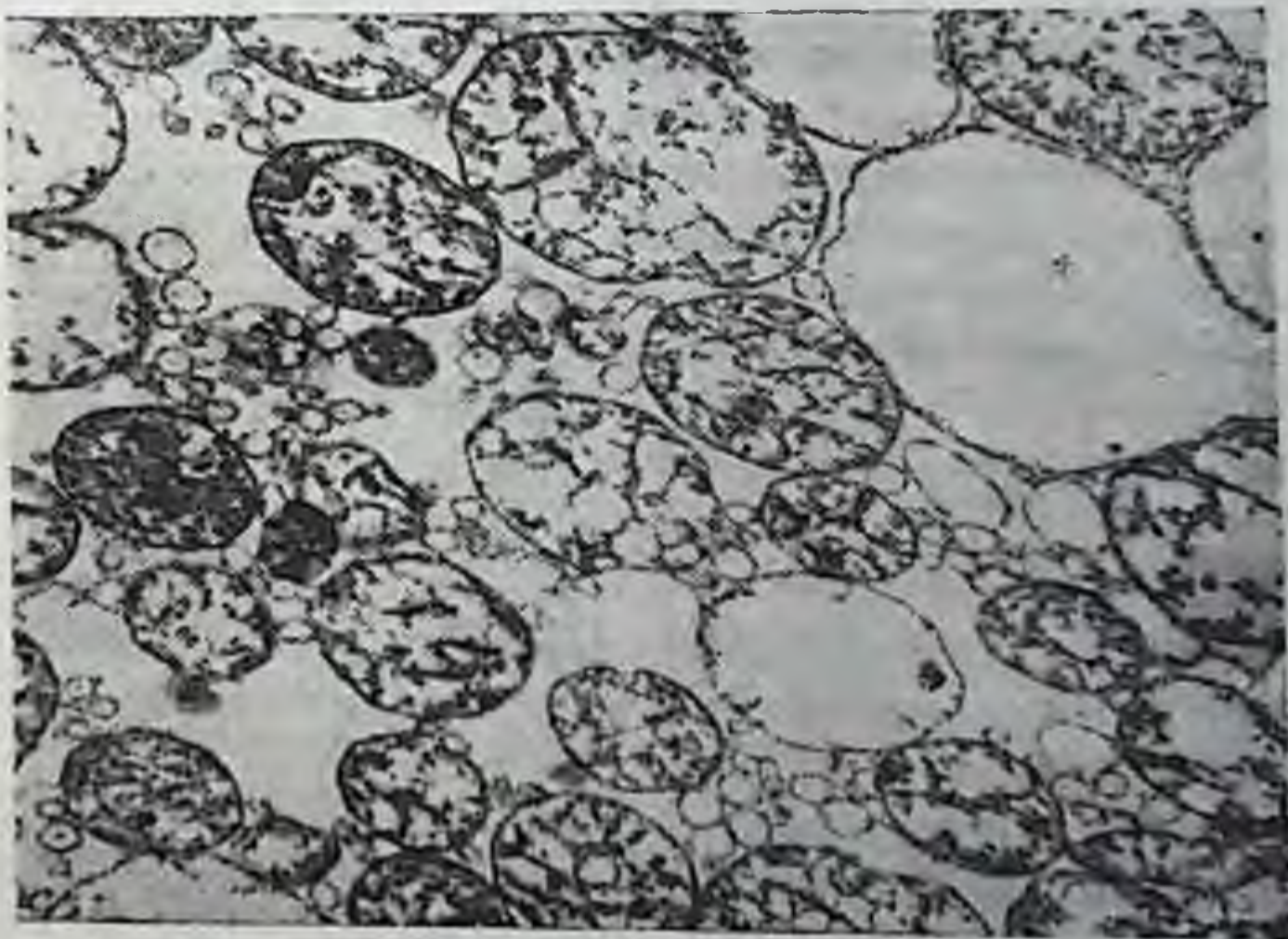


Рис. 25. Митохондриальная фракция печени 9-дневных эмбрионов при введении  $1 \cdot 10^{-4}$  M тироксина. Ув.18000.



вания наступает при добавлении в среду инкубации  $1 \cdot 10^{-4}$  М тироксина. Такое же действие тироксина при окислении сукцината наблюдается при увеличении его дозы в 2—3 раза. Терминальная часть дыхательной цепи в опытах с окислением аскорбата с носителем ТМФД была нечувствительна к указанным дозам.

У взрослых птиц концентрация тироксина  $1 \cdot 10^{-4}$  М приводила к полному разобщению окислительного фосфорилирования на всех субстратах.

С увеличением срока развития зародыша реакция на действие тироксина усиливается (дыхательный контроль на митохондриях сердца и печени). По нашим данным, на 16.—17-й день щитовидная железа эмбрионов уже функционирует и гормоны ее вклю-

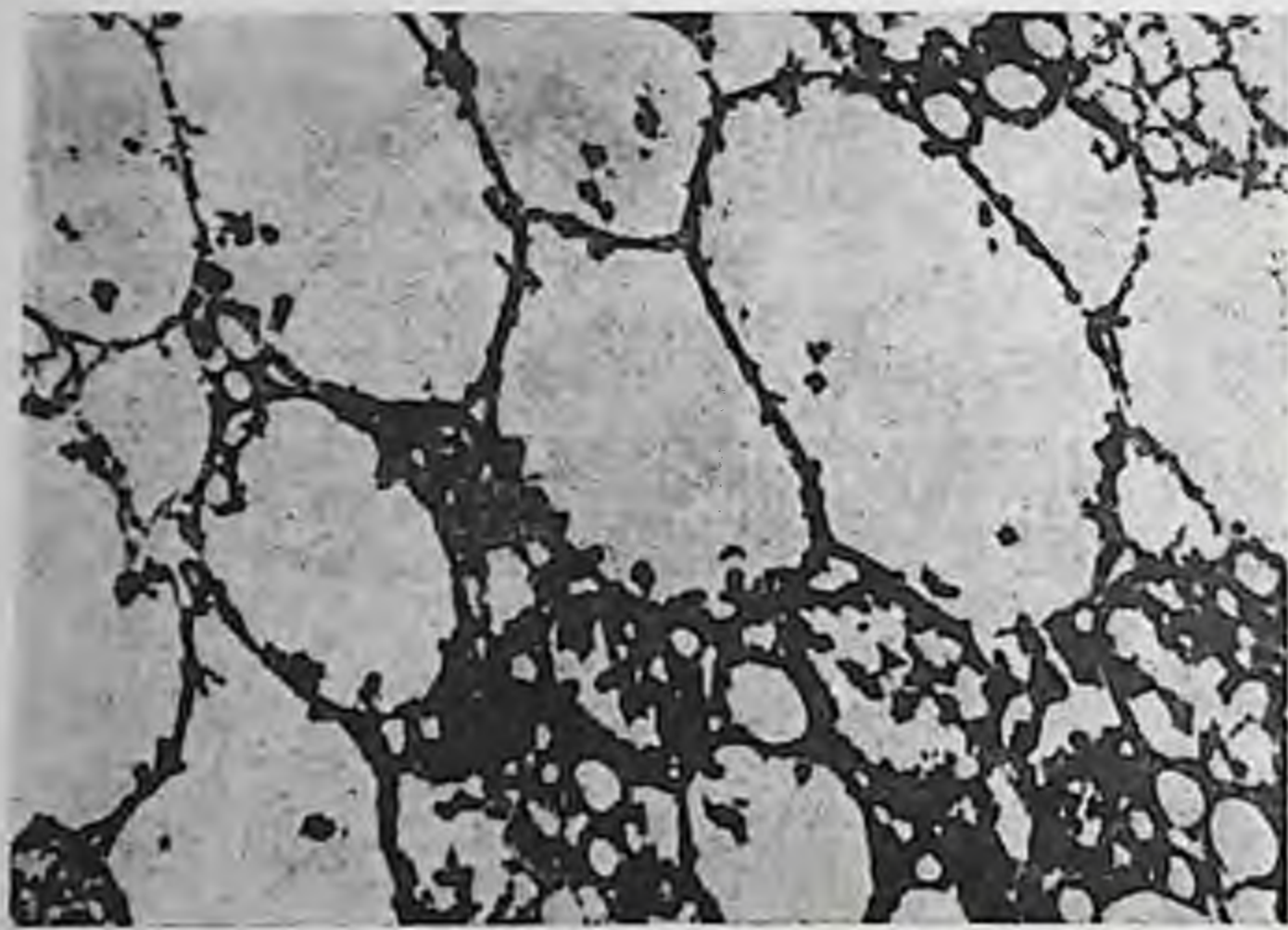


Рис. 26. Митохондриальная фракция печени взрослых кур при введении  $1 \cdot 10^{-4}$  тироксина. Ув. 18000.

чаются в регуляцию метаболизма. Возможно, этим объясняется повышенная чувствительность к тироксину *in vitro*.

Многие исследователи (Romijan et al., 1952; Огородникова, 1969; Газдаров, 1970) предполагают существование определенной связи между усилением реакции на введенный извне тироксин и началом функционирования собственной щитовидной железы эмбриона. Н. Д. Ещенко и М. И. Прохорова (1973), изучая влияние тироксина на активность НАД-специфичных изоцитрат-дегидрогеназ в митохондриях мозга и печени куриных эмбрионов, отметили, что по мере развития эмбриона чувствительность фермента к тироксину возрастает. Возможно, что в ранние сроки развития, когда собственная железа функционирует не в полную силу, экзогенный тироксин не оказывает заметного действия на энергетику исследуемой ткани в системе *in vitro*. На последующих стадиях, когда появляется собственный гормон, реакция усиливается.



У взрослых кур введение гормона в концентрации  $1 \cdot 10^{-4}$  М приводило к полному разобщению окисления и фосфорилирования на всех субстратах, одинаковой скорости потребления кислорода в состоянии 3 и 4 и падению дыхательного контроля.

Морфологические наблюдения позволяют объяснить явление неполного разобщения окислительных и фосфорилирующих процессов у эмбрионов и взрослых птиц. У 9-дневных эмбрионов тироксин вызывает набухание части митохондрий с полной редукцией крист, но наблюдается также большое количество митохондрий с хорошо выраженными кристами (рис. 25). У взрослых же кур происходит полная дезорганизация большинства митохондрий (рис. 26). Полную дезорганизацию при действии *in vitro* тироксина в концентрации  $1 \cdot 10^{-4}$  М наблюдали также на печени взрослых крыс (Туракулов, 1970).

Данные исследований указывают на связь между ультраструктурными изменениями, происходящими в митохондриях печени под влиянием экзогенного тироксина, и биохимическими изменениями энергетического обмена, что дает основание сделать предварительное заключение о меньшей чувствительности эмбриональных митохондрий к тиреоидному гормону по сравнению с той же тканью взрослого организма. Такой вывод согласуется с мнением В. В. Фролькиса (1969) о том, что стареющие ткани обладают повышенной чувствительностью к гормону.

### Влияние тироксина *in vivo*

Быстрая стимуляция дыхания — известная особенность влияния гормонов щитовидной железы на тиреоидэктомированных животных. В эмбриональный период, особенно в ранний, содержание тиреоидного гормона сравнительно низкое. По мере роста зародыша и его щитовидной железы количество гормона в организме увеличивается, но не достигает величин, характерных для взрослых птиц, поэтому для выяснения особенностей действия гормона на метаболизм митохондрий мы вводили в эмбрион физиологические дозы гормона.

Опыты проводили на куриных эмбрионах на 10-й и 16-й дни инкубации. За 3 дня до забоя в яйцо вводили тироксин в количестве 0,03γ 10-дневным эмбрионам и 0,3γ — 16-дневным. Контрольным эмбрионам вводили 0,2 мл 0,02 н. NaOH. Митохондрии печени и сердца выделяли дифференциальным центрифугированием.

На рис. 27 представлены результаты измерения скорости дыхания митохондрий печени и сердца на субстратах глутамат и сукцинат при введении в яйцо тироксина. У 10-дневных эмбрионов скорость дыхания митохондрий печени увеличивается незначительно; скорость дыхания сердечных митохондрий — намного сильнее и наиболее отчетливо при окислении глутамата. На 16-й день развития скорость потребления кислорода митохон-



дриями печени и сердца под влиянием тироксина возрастает как на митохондриях сердца, так и на печени на обоих субстратах. Увеличение скорости дыхания выше, чем у 10-дневных эмбрионов.

Сопряженность процессов окисления и фосфорилирования при введении тироксина на митохондриях сердца снижается. Дыхательный контроль у 10-дневных эмбрионов снижается меньше, чем у 16-дневных. На митохондриях печени дыхательный кон-

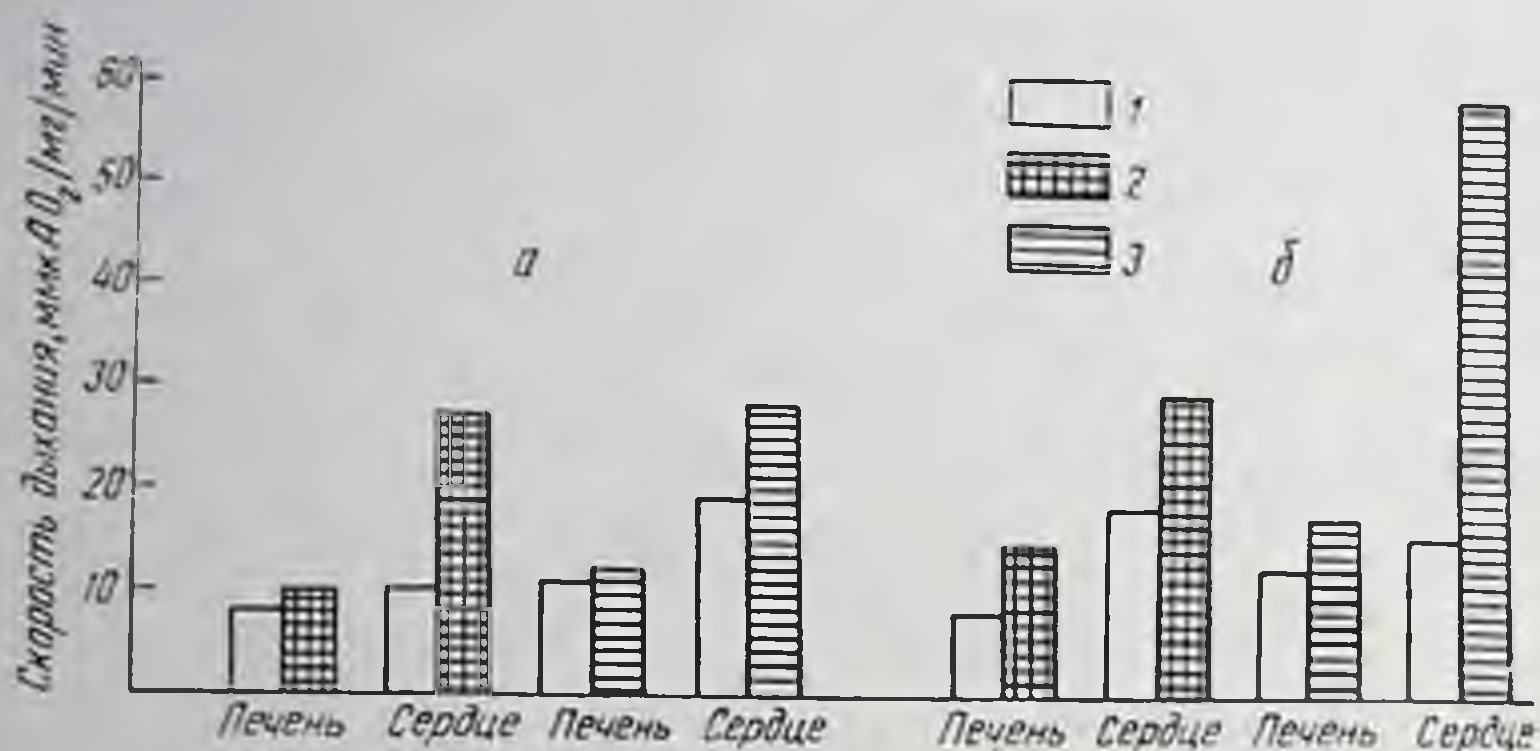


Рис. 27. Скорость дыхания митохондрий печени и сердца в норме и после введения тироксина *In vivo*.

1—контроль, 2—глутамат, 3—сукцинат. То же на рис. 28.

троль после введения гормона в ранние и поздние сроки развития не изменяется (рис. 28).

Сопоставляя данные, характеризующие функциональное состояние энергетического аппарата, можно заключить, что при введении физиологических концентраций тироксина в различные сроки развития эмбриона скорость дыхания митохондрий сердца и печени уменьшается. Аналогичная реакция митохондрий при введении тироксина наблюдается и у взрослого организма (Tata, 1963; Bronk, 1963). Увеличение потребления кислорода наиболее отчетливо проявляется на митохондриях сердца.

R. A. Whaley et al., (1959) в опытах на взрослых крысах отмечали, что однократная инъекция тироксина более быстро и значительно увеличивает потребление кислорода в гомогенатах сердечной мышцы по сравнению с другими тканями, реагирующими на тироксин. Автор связывает это с возрастанием активности цитохрома C, содержание которого прямо пропорционально скорости дыхания.

Тиреоидный статус влияет на скорость окисления и дыхательный контроль. В наших экспериментах при увеличении уровня тиреоидных гормонов скорость дыхания после добавления АДФ ( $V_3$ ) и без АДФ ( $V_4$ ) увеличивается, однако в  $V_4$  изменяется сильнее, вследствие чего снижается дыхательный контроль.



Исследования на взрослых крысах с использованием сукцината (Hoch, 1968; Hoch, Motta, 1968) также показали, что введение тироксина тиреоидэктомизированным животным вызывает довольно значительное повышение скорости окисления в  $V_4$  по сравнению с  $V_3$ , в результате чего дыхательный контроль понижается.

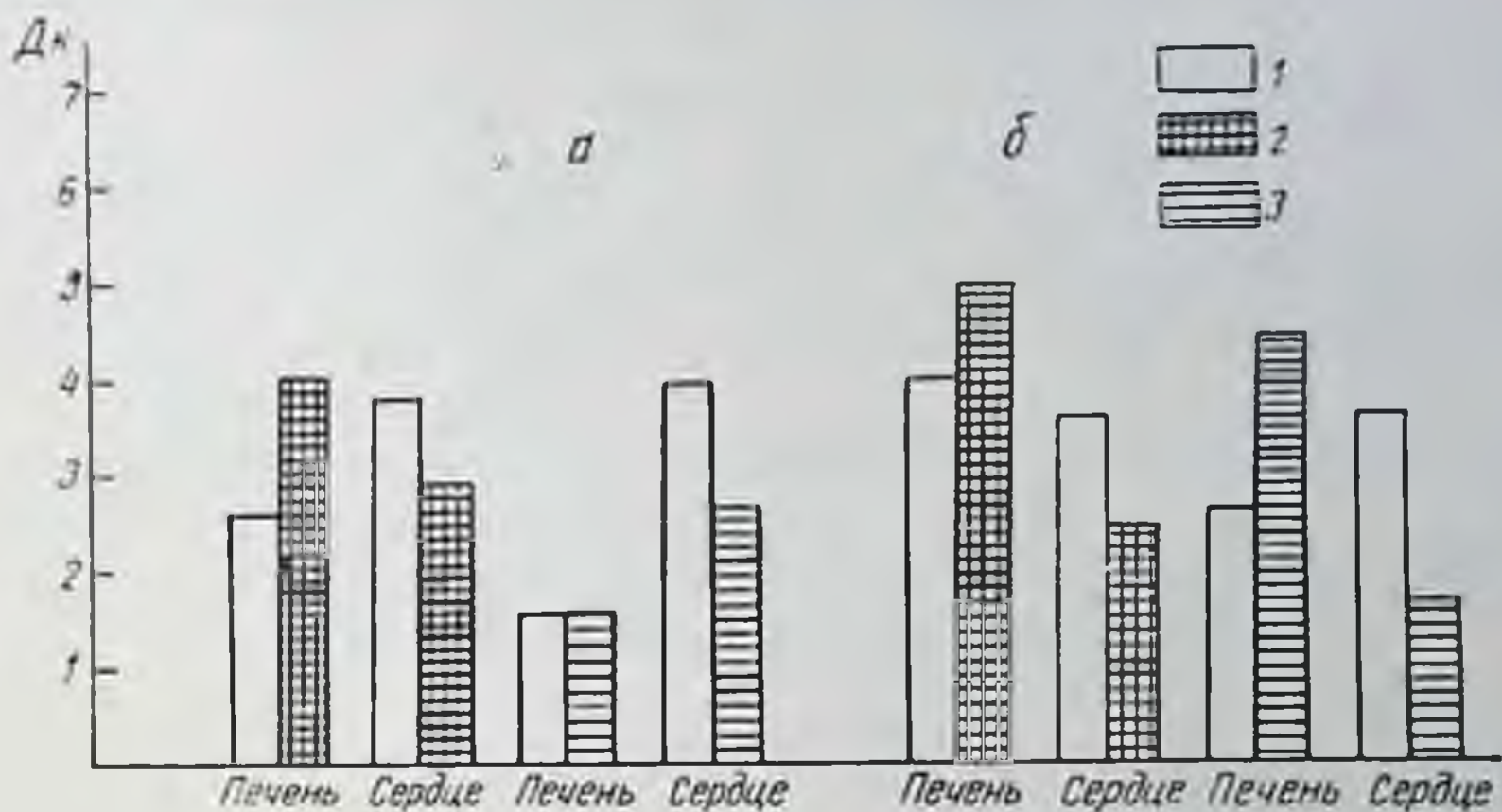


Рис. 28. Величина дыхательного контроля митохондрий печени и сердца в норме и после введения тироксина.

Следовательно, введение куриным эмбрионам тироксина повышает скорость электронного транспорта в изолированных митохондриях.

Наряду со стимуляцией проявляется эффект тироксина, характеризующийся увеличением дыхания в состоянии  $V_4$  и снижением дыхательного контроля.

Результаты электронно-микроскопических исследований структуры митохондрий после введения тироксина и биохимические данные функциональной активности показали, что наряду со стимуляцией электронного транспорта тироксин увеличивает количество крист в митохондриях. По данным ряда авторов (Sokoloff, 1961; Tata, 1967), тироксин увеличивает включение меченых аминокислот в митохондрии и синтез фосфолипидов. Возможно, совместная стимуляция синтеза митохондриального белка и фосфолипидов является предпосылкой образования новых мембранных структур (Tata, 1970, 1971).

Как следует из рис. 29, 30, у тироксинизированных эмбрионов повышается чувствительность к экзогенно добавленному тироксину. На митохондриях печени коэффициент ДК резко снижается по сравнению с контролем. На митохондриях сердца также увеличивается чувствительность дыхательного контроля к тироксину, особенно хорошо это проявляется на 16-й день инкубации. Полученные данные еще раз показывают, что при увели-



чении количества эндогенного тироксина реакция на него усиливается.

Г. И. Медведева (1970), исследуя процессы фосфорилирования митохондрий при различном тиреоидном статусе, отмечает, что

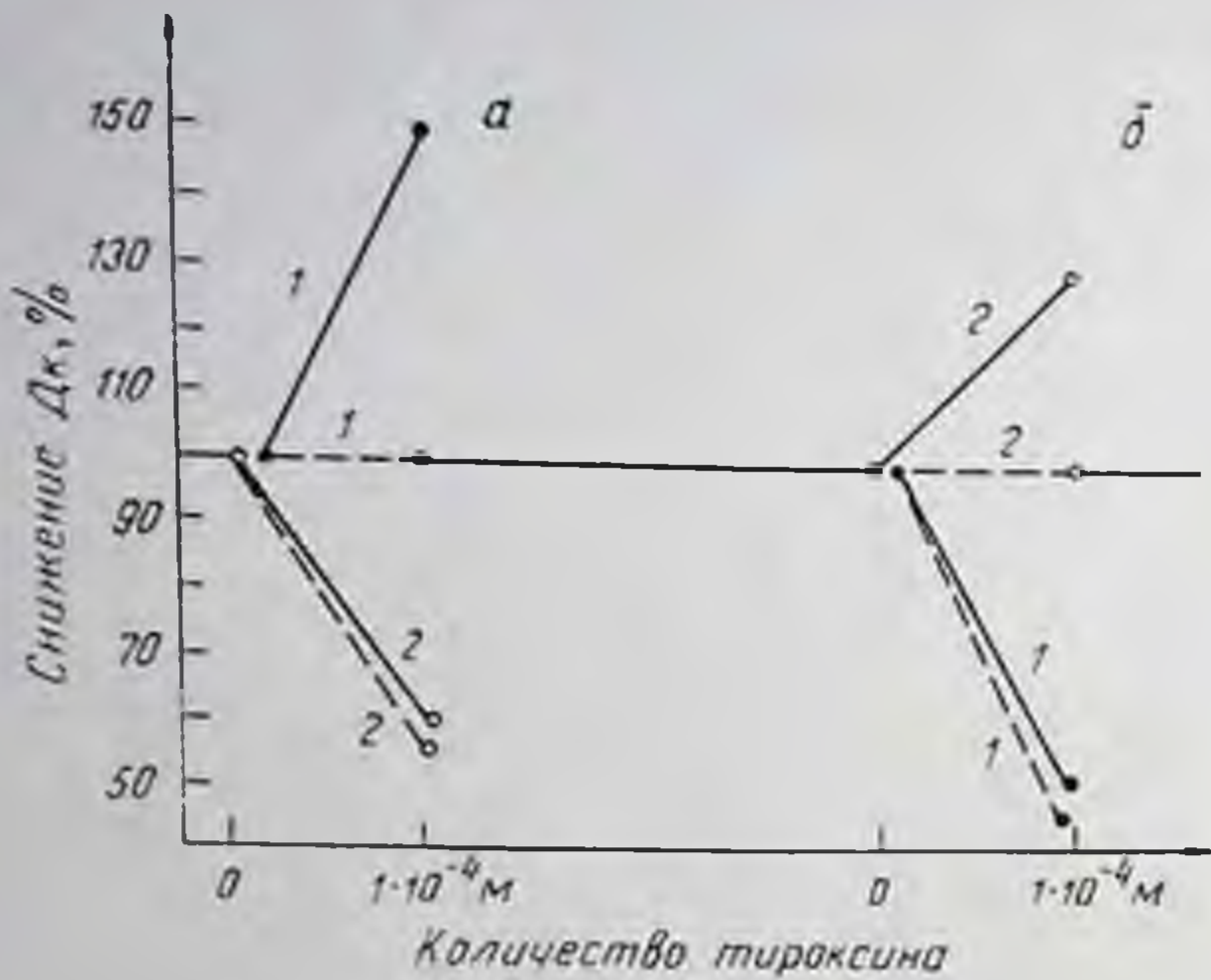


Рис. 29. Влияние тироксина *in vitro* на величину дыхательного контроля митохондрий печени после введения тироксина *in vivo*.

Прямая линия — контроль (введение 0,02 н. NaOH), пунктирная — опыт (введение тироксина 0,015  $\gamma$ /2 веса тела эмбриона); 1 — глутамат, 2 — сукцинат. То же на рис. 30.

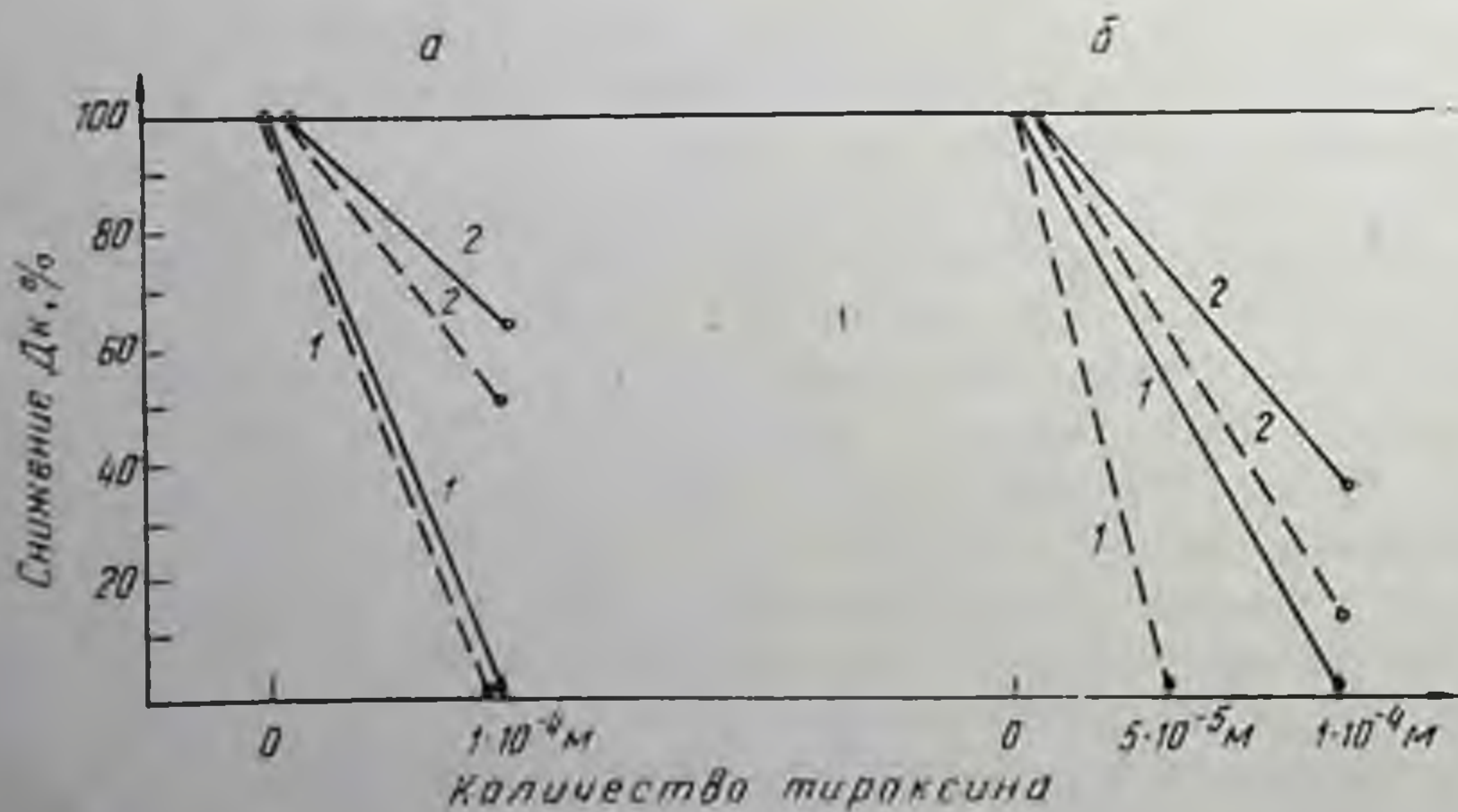


Рис. 30. Влияние тироксина *in vitro* на величину дыхательного контроля митохондрий сердца после введения тироксина *in vivo*.

при гипотиреозе система фосфорилирования митохондрий печени кроликов утрачивает чувствительность к разобщающему дейст-



вию ДНФ. Избыток гормона щитовидной железы у животных с гипертиреозом обуславливает повышенную реактивность митохондрий к действию ДНФ. Кроме того, морфо-химическая зрелость органелл также способствует полноценной ответной реакции клеточных структур. Как показали наши опыты, в ранние сроки развития даже при введении гормонов *in vivo* чувствительность митохондрий усиливается менее заметно, чем в поздние сроки, когда дифференцировка клеток таких органов, как печень и сердце, заканчивается.

Подводя итоги исследований, можно заключить, что в эмбриогенезе при введении тироксина на митохондриях сердца и печени отчетливо проявляется росторазвивающий эффект гормона, выражающийся в стимуляции электронного транспорта по дыхательной цепи и в увеличении количества крист, т. е. образовании новых мембранных структур.

Реакция митохондрий на токсические дозы гормона у эмбрионов ниже, чем у взрослых животных.

Введение тиреоидного гормона эмбрионам повышает чувствительность к разобщающему действию тироксина.



## ЛИТЕРАТУРА

- Абрамова Н. Б., Васильева М. Н. «Онтогенез», 1973, т. 4, № 3, стр. 288—293.
- Бакеева Л. Е., Ясайтис А. А. Митохондрии. Молекулярные механизмы ферментативных реакций. М., «Наука», 1972, стр. 56—65.
- Вильнер Э. А. Особенности тканевого дыхания и фосфорилирования у цыплят разного направления и продуктивности. Автореф. канд. дисс., Краснодар, 1970.
- Гагельганс А. И. [и др.]. Тиреоидные гормоны. Ташкент, Изд-во «Фан», 1972.
- Газдаров А. К., Саприн А. Н., Надаляк Е. А. «Онтогенез», 1970, т. 1, № 3, стр. 289—296.
- Головачев А. Ф., Надаляк Е. А. «Биофизика», 1973, т. 18, № 5, стр. 812—864.
- Джунед Х. Окисление и фосфорилирование в мышечной ткани в эмбриональный и постэмбриональный периоды. Автореф. канд. дисс., М., 1962.
- Ещенко Н. Д., Прохорова М. И. Ферментативные превращения углеводов в животных тканях и их регуляция. Тезисы докл. М., «Наука», 1973.
- Киселев А. Ф., Головачев А. Ф. «Биофизика», 1970, т. 15, № 4, стр. 742—743.
- Козырева Е. В., Митюшин В. М. О взаимосвязи ультраструктуры и функционального состояния митохондрий печени крысы. «Митохондрии. Структура и функция в норме и патологии», М., Наука, 1971.
- Кудзина Л. Ю., Евтодиенко Ю. В. Митохондрии. Ферментативные процессы и их регуляция, М., «Наука», 1968, стр. 93—97.
- Ластовская Л. Н. Тезисы докл. I научн. сессии по итогам 1969 г. Минск, «Наука и техника», 1970.
- Лейбсон Л. Г. [и др.]. Физиологический журн. СССР, 1961, № 47, стр. 900.
- Лейбсон Л. Г., Плисецкая Э. М. ДАН СССР. 1963, т. 150, № 207.
- Ленинджер А. Митохондрии. М., «Мир», 1966.
- Махинько В. И., Шегольков В. Н. «Проблемы возрастной физиологии, биохимии и биофизики. Киев, «Наукова думка», 1974, стр. 231—237.
- Медведева Г. И. Патологич. физиол. и эксперим. терапия, 1970. № 4, стр. 41—46.
- Мирахмедов А. К., Абляева Н. Х., Туйчиев С. Узб. биол. журн. 1975, № 6—9.
- Митюшин В. М., Козырева Е. В., Романцев Е. Ф., «Биологич. науки», 1969, № 5, стр. 46—52.
- Мицкевич М. С. Железы внутренней секреции в зародышевом развитии птиц, М., 1957.
- Мицкевич М. С. Становление эндокринных функций в зародышевом развитии, М., «Наука», 1966, стр. 7—25.
- Огородникова Л. Г. Ферменты в эволюции животных, Л., «Наука», 1969, стр. 111—115.



- Перцева М. Н. «Биохимия», 1961, № 26, стр. 254.
- Перцева М. Н., Желудкова З. П. Ферменты в эволюции животных. Л., «Наука», 1969, стр. 77—85.
- Рацев Р. Р. Митохондрии и тиреоидные гормоны, Л., «Медицина», 1969.
- Рольник В. В. Биология эмбрионального развития птиц, Л., «Наука», 1968.
- Самойлов П. М. Окислительное фосфорилирование и гликолиз в миокарде крыс при экспериментальном тиреотоксикозе. Автореф. канд. дисс., 1963.
- Саркисов Д. С., Втюрин Б. В. Электронная микроскопия деструктивных и регенеративных внутриклеточных процессов. М., «Медицина», 1967.
- Симонян А. А. Митохондрии. Биохимические функции в системе клеточных органелл. М., «Наука», 1969, стр. 116—119.
- Скулачев В. П. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи. М., «Наука», 1962.
- Смоляников Б. В., Разгони И. И. «Сельскохозяйственная биология», 1971, № 6, стр. 296—298.
- Студитский А. М. Эндокринные корреляции зародышевого развития высших позвоночных. М.-Л., Изд. АН СССР, 1947.
- Туйчиев С., Абляева Н. Х., Хамидов Д. Х. ДАН УзССР, 1976, № 1, стр. 57—58.
- Туракулов Я. Х. [и др.]. «Биохимия», 1970, № 35, стр. 349—355.
- Туракулов Я. Х. [и др.]. Узб. биол. журн., 1972, № 3, стр. 6—9.
- Туракулов Я. Х. [и др.]. «Онтогенез», 1973, № 4, стр. 394—403.
- Хамидов Д. Х. [и др.]. Актуальные проблемы физиологии, биохимии и патологии эндокринной системы, М., «Медицина», 1972, стр. 288.
- Фролькис В. В. Биологические механизмы развития старения. Киев, Медгиз УССР, 1963, стр. 131—150.
- Abdel-Latif A. A., Brody J., Ramahi A. J. Neurochem., 1967, 14, p. 1133—1141.
- Balazs R. Brain Research, 1970, 25, p. 555—570.
- Balazs R. In: «Cellular Aspects of Growth and Differentiation in Nervous Tissue». UCLA Forum in Medical Sciences Univ. Calif Press, Los-Angeles, 1970 a.
- Balazs R. In: «Handbook of Neurochemistry (Edited Lajtha)». vol. III, Plenum Press, New York, 1970 b.
- Balazs R., Gaitonde M. K. Biochem. J., 1968, 106, p. 1—2.
- Balazs R. [et al.]. J. Neurochem., 1968, 15, p. 1335—1349.
- Balazs R. [et al.]. J. Physiol. (London), 1969, 201, p. 28—29.
- Balazs R. [et al.]. In: «Hormones in development», 1971, p. 357—378.
- Balinsky J. B., Shambaugh G. E., Cohen P. P. J. Biol. Chem., 1970, 245, p. 128.
- Berl S. J. Biol. Chem., 1965, 240, p. 2047—2054.
- Blond D. M., Whittam R. Biochem. J., 1965, 97, p. 523—531.
- Bronk J. R. Science, 1963, 141, p. 3883.
- Bronk J. R. Biochem. Biophys. Acta, 1963 a, 69, p. 375.
- Bronk J. R. Science, 1965, 141, p. 816.
- Bronk J. R., Bronk M. S. J. Biol. Chem., 1962, 237, p. 897.
- Buffa P. [et al.]. Nature, 1970, 226, N 5242, p. 272—274.
- Chittoni N. E., Gomez C. J., Life Sci., 1964, 3, p. 979—986.
- Cocks J. A., [et al.]. J. Neurochem., 1970, 17, p. 1275—1285.
- Cohen P. P. The Harvey Lectures, 1966, 60, p. 119—154.
- Cohen P. P. Science, 1970, 168, N 3931, p. 533—543.
- Corner A. Recent. Progr. Hormone Res., 1965, 21, p. 205—236.
- Cuaron L. J. Physiol (London), 1963, 168, p. 613—630.
- Eaton J. E., Frieden J. E. In: «Progress in comparative endocrinology», New York, London, p. 398—407, 1969.
- Eayrs J. T. In: «Regional Neurochemistry», New York, 1961, p. 423—436.
- Eayrs J. T. Arch. Biol., 1964, 75, p. 529—565.
- Eayrs J. T. In: «Brain-Thyroid Relationships», 1964a, p. 60—74.
- Eayrs J. T. In: «Sci. Basis Med. Ann. Rev.», 1966, p. 317—339.
- Eayrs J. T. In: «Endocrinology and Human Behaviour». Oxford Univ. Press. London, 1968, p. 239—255.



- Eayrs J. T., Goodhead G. J. *Anat. (London)*, 1959, 93, p. 385—402.
- Etkin W. *Metamorphosis*. In: «Physiology of Amphibia». New York. Academic Press Inc., 1964, p. 427—468.
- Evans H. M., Simpson M. E., Pencharz R. *Endocrinology*, 1939, 25, p. 175.
- Fahien L. A., Wiggert B. O., Cohen P. P. *J. Biol. Chem.*, 1965, 240, p. 1083, 1091.
- Fazekas J. F., Graves F. B., Alman R. W. *Endocrinology*, 1951, 48, p. 169—174.
- Freeman K. B., Roodyn D. B., Tata J. R. *Biochem. Biophys. Acta*, 1963, 72, p. 129.
- Frieden E. *Recent Progr. Hormone Res.*, 1967, 23, p. 139.
- Garcia Argiz C. A. [et al.]. *Brain Res.* 1967, 6, p. 645—646.
- Geel S. E., Timiras P. *Endocrinology*, 1967, 80, p. 1069—1074.
- Geel S. E., Valcana T., Timiras P. *Brain Res.*, 1967a, 4, p. 143—150.
- Geel S. E., Timiras P. S. In: «Hormones in development», New York, 1971, p. 391—401.
- Gelberg S. [et al.]. *J. Neurochem.*, 1964, 11, p. 221—229.
- Gomez C. J. In: «Hormones in development». New York, 1971, p. 417—433.
- Gomez C. J., Ramirez de Guglielmone A. E. *J. Neurochem.*, 1967, 14, p. 1119—1128.
- Gorbman A. In: «Comparative Endocrinology», New York, 1963, p. 291—324.
- Gorbman A. *Handbook comparative endocrinology*. New York, 1967.
- Green K., Matty A. J. *J. Endocrin.*, 1964, 28, p. 205—211.
- Green D. E., Fleischer S. *Metabol. pathways*, 1960, 1, p. 41.
- Greengard O. *Clin. Pharmacol. and Ther.*, 1973, 14, N 4, p. 721—725.
- Greengard P., McIlwain H. In: «Biochemistry of the Developing Nervous System», p. 251—260, New York, 1955.
- Gross N. Y. *Cell. Biol.*, 1971, 48, p. 29.
- Gudernatsch J. F. *Arch. Entwicklungsmech. Organ*, 1912, 35, p. 457.
- Gustafsson R. [et al.]. *J. Cell. Biol.*, 1965, 26, p. 555—578.
- Hackenbrock C. R. *J. Cell. Biol.*, 1968, 37, p. 345.
- Hamburgh M. *Gen. comp. Endocr.*, 1968, 10, p. 198—213.
- Hamburgh M., Flexner L. B. *J. Neurochem.*, 1957, 1, p. 279—288.
- Hamburgh M., Lynn E., Weiss E. P. *Anat. Rec.*, 1964, 150, p. 147—159.
- Hamilton T. H. *Science*, 1968, 161, p. 649—661.
- Heushaw E. C., Bojarski T. B., Hiatt H. H. *J. Molec. Biol.*, 1963, 7, p. 122—129.
- Himwich W. A. *Int. Rev. Neurobiol.*, 1962, 4, p. 117—158.
- Hoch F. L. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1968, 124, p. 238.
- Hoch F. L., Motta M. V. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1968, 59, p. 118.
- Hoffman J. F. *Circulation*, 1962, 26, p. 1201—1213.
- Hoffman J. F., Tosteson D. C. *Abstr. Biophys. Soc. Pittsburgh*, 1959.
- Jost A. *Arch. Anat. Micr. Morph. Exp.* 1960, 49, p. 431—457.
- Kaltenbach J. C. *J. Exp. Zool.*, 1970, 174, N 1, 55—63.
- Kandemir N. E. [et al.] *Endocrinology*, 1966, 78, p. 505—510.
- Lahiri S., Lajtha A. *J. Neurochem.*, 1964, 11, p. 77—86.
- Lajtha A. *Int. Rev. Neurobiol.*, 1964, 6, p. 1—98.
- Lardy H. A., Lee Y. L., Takemori A. *Proc. New York Acad. Sci.*, 1960, 86, p. 506.
- Legrand J. *Arch. Anat. micr. Morph. exp.*, 1967, 56, p. 203—214.
- Matty A. J., Green K. *Life Sci.*, 1962, 9, p. 487—489.
- Merei F. T., Gallyas F. J. *J. Neurochem.*, 1964, 11, p. 265—270.
- Michels R., Cason J., Sokoloff L. *Science*, 1963, 140, p. 1417—1418.
- Minakami S., Kakinuma K., Yoshikawa H. *Biochem. Biophys. Acta*, 1963, 78, p. 808—811.
- Minz H. A. [et al.]. *J. Cell. Biol.*, 1967, 34, p. 513.
- Maury D. N., Crane F. L. *Biochemistry*, 1964, 3, p. 1068.
- Myant N. B., Cole L. A. *J. Neurochem.* 1966, 13, p. 1299—1307.
- Pasquini L. M. [et al.]. *Brain Res.*, 1967, 6, p. 621—634.



- Petermann M. L. The physical and Chemical Properties of ribosomes. Amsterdam, 1964.
- Purpura D. P. [et al.]. *Progr. Brain. Res.*, 1964, 4, p. 187—221.
- Rabinowitz M., Swift H. *Physiol. Rev.*, 1970, 50, p. 376.
- Radha E., Krishnamoorthy R. V. *Comp. Biochem. and Physiol.*, 1973, B45, N 4, p. 847—865.
- Rall J. E., Robins J., Lewallen C. C. In: «Hormones». New York, 1964.
- Roberts S., Zomzely C. E. In: «Proteides of the biological fluids». 1966.
- Romijan C., Funk K. F., Lokhorst W. *Poultry Sci.*, 1952, 31, p. 684.
- Roodyn D. B., Erreeman K. B., Tata J. R. *Biochem. J.*, 1965, 94, p. 628—641.
- Sampson F. E. Jr., Quinn D. J. *J. Neurochem.*, 1967, 14, p. 421—427.
- Saxen L. [et al.]. *Endocrinology*, 1957, 61, p. 35.
- Schade J. P., Van Backer H., Colon E. *Progr. Brain. Res.*, 1964, 4, p. 150—175.
- Schapiro S. *Endocrinology*, 1966, 78, p. 527—532.
- Schapiro S. *Gen. and comp. endocrinology*, 1968, 10, p. 214—228.
- Swark W., Singhal R. L., Ling G. M. *Can. J. Pharmacol.*, 1971, 49, N 6, p. 598—607.
- Siekevitz P. [et al.]. In: «Organizational Biosynthesis». New York, 1968, p. 331—362.
- Smith D. W., Blizzard R. M., Wilkins L. *Pediatrics*, 1957, 19, p. 1011.
- Smith K. A., Cheldelin V. H., Newburgh R. W. *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 78, p. 66.
- Sokoloff L., Kaufman S. J. *Biol. Chem.*, 1961, 236, p. 795.
- Sperry W. M. In: «Neurochemistry», 1964, p. 187—221.
- Szepsenwol J., Partrielle M. H. *Amer. J. Physiol.*, 1952, 171, p. 257.
- Tata J. R. In: «Action of hormones of molecular processes». New York, 1964, p. 58—131.
- Tata J. R. In: «*Progr. Nuch. Acid. Res. and Molec. Biol.*», 1966, 5, p. 191—250.
- Tata J. R. *Biochem. J.*, 1967, 104, p. 1—16.
- Tata J. R. *Biochem. J.*, 1967 a, 105, p. 783—801.
- Tata J. R. *Nature*, 1967 b, 213, p. 566—569.
- Tata J. R. *Nature*, 1968, 219, p. 331—337.
- Tata J. R. *Biochem. J.*, 1970, 116, p. 617.
- Tata J. R. In: «Hormones in development». New York, 1971, p. 19—40.
- Tata J. R. [et al.] *Biochem. J.*, 1963, 86, p. 408.
- Tata J. R., Williams-Ashman H. G. *European J. Biochem.*, 1967, 2, p. 366—374.
- Tatibana M., Ito K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1967, 26, p. 221.
- Tobin R. B., McIlwain H. *Biochem. Biophys. Acta*, 1965, 105, p. 191—192.
- Tobin R. B., Slater E. C. *Biochem. Biophys. Acta*, 1965, 105, p. 214—220.
- Tzajnova M., Mourek S. *Physiol. Bohemosl.*, 1973, 22, N 2, p. 179—184.
- Valcana T., Timiras P. S. In: «Hormones in development», 1971, p. 453—463.
- Van Rossum. *Biochem. Biophys. Acta*, 1963, 74, p. 15.
- Vernadakis A., Woodbury D. M. *Amer. J. Physiol.*, 1962, 203, p. 748—752.
- Waehnel F. Y., Grossfeld R. M., Shoofer E. M. II Intern. Meet. *Neurochem. Milano*, 1969, p. 411—420.
- Whaley R. A., Hart T. M., Klitgaard H. M. *Amer. J. Physiol.*, 1959, 196, p. 1258.
- Whittam R., Blond D. M. *Biochem. J.*, 1964, 92, p. 147—158.
- Weiss R. M., Noback C. R., *Endocrinology*, 1949, 45, p. 389—395.
- Westerfield W. W., Richert D. A., Ruegamer W. R. *Endocrinology*, 1965, 77, p. 802—811.
- Wiggert B. O., Cohen P. P. *J. Biol. Chem.*, 1966, 241, p. 210.
- Wilkins L. In: «The diagnosis and treatment of endocrine disorders in childhood and adolescence», 2nd ed. Springfield, Illinois, 1957.
- Wysocki S. J., Segal W. *Eur. J. Biochem.*, 1972, 28, N 2, p. 183—189.
- Yamagami S., Fritz R. R., Rappoport D. A. *Biochem. Biophys. Acta*, 1966, 139, p. 532—547.



## ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.	3
Глава I. Молекулярные механизмы гормональной регуляции генетической активности в процессе дифференцировки клеток.	5
Участие гормонов в дифференцировке клеток.	5
Гормональный контроль дифференциальной активности гигантских хромосом насекомых.	7
Общие принципы включения и выключения активности генов.	10
Механизм контроля процессов трансляции специфической иРНК, индуцированной стероидными гормонами.	14
Контроль транскрипции генов стероидными гормонами.	17
Контроль генетической активности тиреоидными гормонами.	21
Некоторые молекулярные аспекты гормональной регуляции процессов транскрипции генома насекомых.	39
Субклеточное распределение и специфическое связывание стероидных гормонов с внутриклеточными рецепторами.	41
Внутриклеточное распределение и специфическое связывание тиреоидных гормонов.	57
Литература.	79
Глава II. Влияние тиреоидных гормонов на структуру и функцию митохондрий в развитии.	88
Действие тиреоидных гормонов на рост и развитие.	88
Влияние тиреоидных гормонов на дифференцировку энергетических механизмов головного мозга.	90
Действие тиреоидных гормонов на внутриклеточные мембранные структуры.	95
Динамика развития функциональной активности и ультраструктуры митохондрий в онтогенезе.	98
Структурные изменения эмбриональных митохондрий под влиянием тироксина в пре- и постнатальный периоды.	109
Влияние тироксина на дыхание и окислительное фосфорилирование эмбриональных митохондрий сердца и печени.	117
Литература.	126



Реакция эмбриональных тканей на действие гормонов. (Отв. ред. акад. АН УзССР Я. Х. Туракулов). Т., «Фан», 1976.

131 с. с черт. (АН УзССР. Ин-т биохимии)  
Список лит. сс. 79—87, 126—129.

Перед загл. авт.: Д. Х. Хамидов, А. Абдукаримов, Н. Х. Абляева и А. К. Мирахмедов.

И. Хамидов Д. Х. и др.

57.04

Д. Х. Хамидов, А. Абдукаримов,  
Н. Х. Абляева, А. К. Мирахмедов

## РЕАКЦИЯ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ТКАНЕЙ НА ДЕЙСТВИЕ ГОРМОНОВ

*Утверждено к печати Ученым Советом Института биохимии,  
Отделением биологических наук АН УзССР*

Редактор Т. Шур  
Художник А. Ошейко  
Технический редактор Л. Тюрина  
Корректор Л. П. Водолазская

P05339. Сдано в набор 24/V-76 г. Подписано в печать 15/VI-76 г. Формат 60×90<sup>1/16</sup>. Бумага тип. № 1. Бум. л. 4,125. Печ. л. 8,25. Уч-изд. л. 8,0. Изд. № 1876. Тираж 1500.  
Цена 1 р. 4 к.

Типография издательства «Фан» УзССР, г. Ташкент, проспект М. Горького, 79. Заказ 129.  
Адрес издательства: г. Ташкент, ул. Гоголя, 70.



*ИЗДАТЕЛЬСТВО „ФАН“  
УЗБЕКСКОЙ ССР*

**ВЫШЛИ ИЗ ПЕЧАТИ**

**Зуфаров К. А. Структурные основы компенсаторно-приспособительных процессов**

В монографии представлена морфофункциональная характеристика адаптивных процессов на органном, тканевом, клеточном и субклеточном уровнях при экспериментальных воздействиях и некоторых заболеваниях. Использование комплекса современных методов исследования позволило объединить различные уровни течения компенсаторно-приспособительных процессов в зависимости от функциональной специфики внутренних органов.

Книга предназначена для гистологов, цитологов, биологов и медиков широкого профиля.

Заказы просим направлять по адресу:  
*Ташкент, ГСП, ул. Навои, 30,  
Узбекское объединение книжной торговли.*



103.