

УДК 591.315 : 576.355.1

ФИЗИОЛОГИЯ

Н.Г. ГРИГОРЬЕВ, Ю.Б. ШМУКЛЕР

ИЗУЧЕНИЕ РЕГУЛЯЦИИ ЦИТОКИНЕЗА  
РАННИХ ЗАРОДЫШЕЙ МОРСКОГО ЕЖА  
С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ПРОБОЯ МЕМБРАНЫ

(Представлено академиком П.Г. Костюком 20 VI 1985)

Исследования регуляторных функций "донервных" медиаторов [1, 2] связаны с проблемой введения соответствующих веществ в клетки. На зародышах иглокожих, являющихся одним из основных объектов эмбриофизиологических исследований [3], микроинъекция сопряжена со значительными методическими трудностями. В данной работе для их преодоления использован принцип электрического пробоя мембраны клетки [4]. Для создания необходимого падения напряжения в случае яйцеклеток *Strongylocentrotus intermedius*, имеющих диаметр около 100 мкм, необходима напряженность поля равная 1 кВ/см. С этой целью использовали устройство (рис. 1), в котором импульсное электрическое поле создавалось при помощи разряда конденсатора между двумя никелевыми электродами экспериментальной камеры; постоянная времени импульса для использованного нами раствора — 200 мкс. Электрический пробой осуществляли в среде следующего состава: 0,5 М КСl, 1 мМ трис-НСl при рН 7,6 и содержании ионов кальция около 100 мкМ.

Для контроля проникновения экзогенных веществ в клетку использован флуоресцеин в концентрации 10 мкМ, добавляемый в экспериментальную среду. После электрического пробоя и трехкратной отмывки клеток нормальной морской водой их фотометрировали. Отметим, что повышение уровня  $Ca^{2+}$  до 1 мМ в среде ведет к резкому уменьшению проникновения флуоресцеина в клетки, а снижение уровня  $Ca^{2+}$  с помощью ЭГТА до 10–100 нМ ведет к необратимому повреждению клеток после электрического пробоя и отмывки их искусственной морской водой

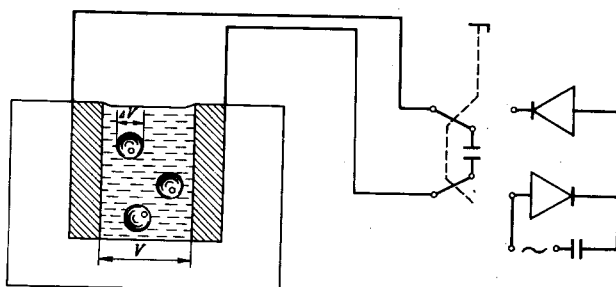


Рис. 1. Схема устройства для электрического пробоя клеточной мембраны. Заштрихованы никелевые электроды, образующие лицевые стенки камеры; боковые стенки и дно — фторопласт. При разряде накопительной емкости пиковая напряженность электрического поля 1 кВ/см, падение напряжения на клетке 10 В

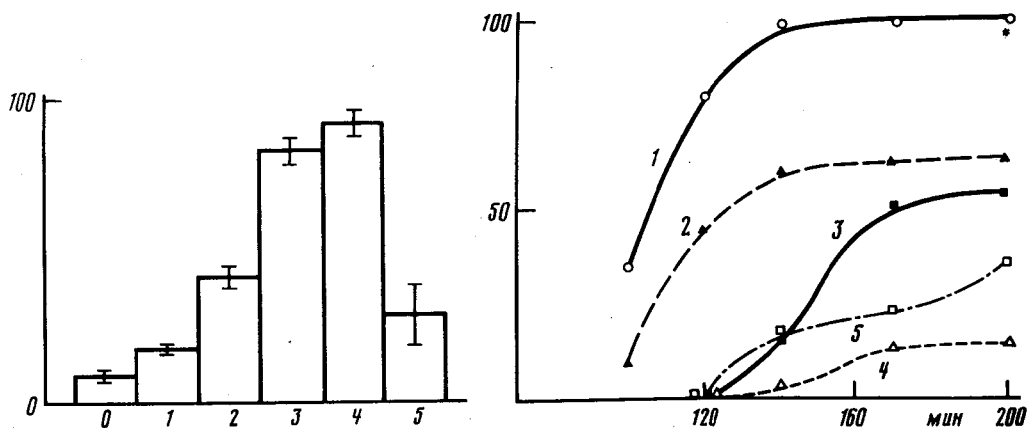


Рис. 2. Зависимость интенсивности флуоресценции оплодотворенных яйцеклеток, подвергнутых пробою в растворе флуоресцеина (100 мкМ), от числа электрических импульсов, подававшихся с интервалом 10 с. Абсцисса – число импульсов, ордината – относительные показатели флуоресценции, приведенные к уровню зародышей, не обработанных флуоресцеином и не подвергавшихся электрическому пробою

Рис. 3. Скорость возобновления развития зародышей, подвергшихся электрическому пробою, при действии экзогенных регуляторных веществ (на примере одного опыта). Абсцисса – время с момента оплодотворения, ордината – число зародышей, прошедших 1-е деление дробления (% от общего числа зародышей в пробе). 1 – развитие при введении форсколина (240 мкМ), 2 – серотонина (500 мкМ), 3 – цАМФ (300 мкМ), 4 – фосфодиэстеразы (500 мкг/мл), 5 – контроль (без добавления экзогенных веществ). Звездочкой показан момент, когда зародыши, обработанные форсколином и серотином, находились на стадии 8 бластомеров, а в остальных пробах – на стадии 2 или 4 бластомера

[3] с нормальным содержанием ионов кальция. Интересно, что при помощи использованного нами устройства и нормальной морской воды в качестве среды можно получить 100%-ную активацию неоплодотворенных яйцеклеток *S. intermedius*, причем 10–20% из них способны к цитокинезу (через 1,5–2,5 ч после активации).

Показано, что количество флуоресцеина, проникшего в клетку, зависит от числа электрических импульсов (рис. 2). Увеличение числа импульсов до определенного предела усиливало флуоресценцию клеток, однако затем новые импульсы, вероятно, приводили к необратимым нарушениям клеточной мембраны и, соответственно, к потере флуоресцеина при отмывке зародышей нормальной морской водой. В дальнейшем перед каждым экспериментом по введению экзогенных веществ-регуляторов подбирали такое количество импульсов, при котором, с одной стороны, наблюдалась максимальная флуоресценция клеток, а с другой – сохранялась их способность к делению. Само по себе такое экспериментальное воздействие безразлично для зародышей – логично предполагать, что так же легко, как экзогенные вещества проникают в клетку, эндогенные водорастворимые соединения ее покидают, чем, по-видимому, и объясняется задержка деления клеток зародышей после электрического пробою на 1–1,5 ч по сравнению с интактными. От 10 до 90% зародышей (в разных опытах), подвергшихся воздействию 3–4 импульсов, были способны после указанной задержки вступать в цитокинез, и темп их дальнейшего развития не отличался от нормы.

Влияние экзогенных регуляторных веществ оценивали по скорости возобновления делений дробления, а также доле зародышей, способных к делению по сравнению с подвергшимися электрическому пробою в среде, не содержащей экзоген-

Таблица 1

Влияние экзогенных регуляторных веществ на возобновление делений дробления зародышей морского ежа после электрического пробоя мембраны

Вещество	Концентрация вещества, мкМ	0–20 мин	21–50 мин	Больше 50 мин
		Процент развивающихся зародышей по сравнению с контрольными не обработанными экзогенными регуляторными веществами; вероятность		
цАМФ	300	+3,8 ± 1,6; > 0,95	+9,8 ± 3,9; > 0,95	+17,2 ± 3,5; > 0,999
Серотонин	500	+14,4 ± 6,2; > 0,95	+13,2 ± 4,3; > 0,95	+22,0 ± 4,9; > 0,99
Форсколин	240	+32,4 ± 11,3; > 0,95	+35,9 ± 6,8; > 0,99	+37,4 ± 5,4; > 0,999
Фосфодиэстераза	500 мкг/мл	-7,9 ± 3,5; > 0,95	-7,0 ± 2,2; > 0,99	-9,7 ± 3,5; > 0,95

Примечание. Отсчет времени велся с момента появления первых развивающихся зародышей, подвергнутых электрическому пробоя мембраны без добавления регуляторных веществ.

ных регуляторов. Серотонин, цАМФ, а в особенности активатор аденилатциклазы форсколин ускоряли начало 1-го деления дробления на 10–35 мин по сравнению с контрольными зародышами и увеличивали общее число развивающихся зародышей; фосфодиэстераза циклических нуклеотидов имела противоположные эффекты (например, задержка возобновления развития в среднем на 25 мин, см. рис. 3 и табл. 1). Следует отметить, что эти вещества в использованных концентрациях не влияют на развитие интактных зародышей *S. intermedius*. Полученные данные соответствуют результатам наших ранних наблюдений способности холерного токсина (также являющегося активатором аденилатциклазы) увеличивать число делящихся зародышей морских ежей в опытах, где наблюдался спонтанно низкий процент делений, и данным о способности цАМФ в больших концентрациях ускорять развитие интактных зародышей морских ежей [5]. Нельзя исключать возможность, что исследуемые вещества могут оказывать непосредственное влияние на время существования мембранных пор, уменьшая, таким образом, утечку существенных для цитокинеза регуляторных веществ. Эта возможность, однако кажется менее вероятной по сравнению с их воздействием на систему управления цитокинезом, так как время существования мембранных пор оценивается нами по результатам введения флуоресцеина в 2–4 с при 20 °С, что недостаточно для проявления метаболических эффектов вводимых веществ, особенно фосфодиэстеразы. На основании изложенных выше, а также более ранних данных [6, 7] можно, таким образом, сделать обоснованное предположение о позитивной регуляторной роли "донервного" медиатора серотонина и цАМФ, что и предполагалось ранее [8–10].

Примененная модификация метода электрического пробоя клеточной мембраны позволяет осуществить массовое введение различных, в том числе макромолекулярных, веществ в клетку с возможностью контроля их проникновения и может использоваться для решения целого ряда задач на зародышах морских беспозвоночных.

Институт биологии развития  
им. Н.К. Кольцова  
Академии наук СССР, Москва

Поступило  
8 X 1985