

Ю.И.Посудин

**Биофизик
Сергей Чахотин**

Киев 1995

УДК 578.6

Посудин Ю.И. Биофизик Сергей Чахотин. Киев: Изд-во Нац. аграрного ун-та, 1995. 98 с.

Рассмотрены биографические сведения и основные этапы научной деятельности выдающегося биофизика Сергея Чахотина, впервые использовавшего сфокусированное ультрафиолетовое излучение для воздействия на клетку и разработавшего целую серию уникальных методов и инструментов для операций над микрообъектами. Показана перспективность идей С. Чахотина в современных научных исследованиях.

Рецензент: доктор биологических наук, профессор И.Н.Гудков

Posudin Yu.I. Biophysicist Sergei Tschachotin. Kiev: Natl. Agricult. Univ. Publ., 1995. 92 P.

The biographical information and the main stages of the scientific activity of the prominent biophysicist Sergei Tschachotin who was the first to use ultraviolet micropuncture for influence upon a cell and to work out a number of unique methods and devices for operations with microobjects are considered. The development of the concepts of S. Tschachotin in modern scientific investigations are demonstrated.

Possoudine J.I. Biophysicien Serg Tchachotine. Kiev. Nat.Univ. d'Agricult. Publ. 1995. 92 p.

On a considere des donnees biographiques et les principaux etapes de l'activite scientifique de celebre biophysicien Serg Tchachotine qui a ete le premier qui a utilise micropuncture ultraviolette pour l'influence a la cellule et qui a elabore toute une serie des methodes unicaux et des instruments pour les operations avec les microobjets. On a montre la perspective des idees de S.Tchachotine aux recherches scientifiques modernes.



Об авторе

Юрий Иванович Посудин – профессор, доктор биологических наук, заведующий кафедрой биофизики Национального аграрного университета, Киев, Украина.

Окончил в 1969 г. радиофизический факультет Государственного университета им. Шевченко. Защитил диссертации: в 1977 г. – на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук (Институт радиотехники и электроники АН СССР, Москва), в 1992 г. – на соискание ученой степени доктора биологических наук (Агрофизический Институт, Санкт-Петербург).

Основные научные интересы автора – применение методов оптической и лазерной спектроскопии для неразрушающей оценки качества сельскохозяйственной продукции и контроля окружающей среды.

Участвовал в научных исследованиях в институтах и университетах Италии, Испании, США, Японии, Германии.

Педагогическая деятельность проф. Ю.И. Посудина связана с преподаванием дисциплин „Физика с основами биофизики”, „Биофизика”, „Методы измерения параметров окружающей среды” и спецкурсов „Биофизика окружающей среды” и „Методы неразрушающей оценки качества сельскохозяйственной продукции”. В 1996 г. читал лекции как Фулбрайтский стипендиат в США.

Автор учебников и монографий: „Лазерная фотобиология” (1989 г.), „Біофізика”(1995 р.), „Спектроскопічний моніторинг агросфери” (1998 р.), „Lasers in Agriculture” (1998 р.), „Фізика і біофізика навколишнього середовища”(2000 р.), „Методи вимірювання параметрів навколишнього середовища” (2002 р.), „Фізика з основами біофізики” (2003 р.), „Physics with Fundamentals of Biophysics” (2004 р.), „Біофізика рослин” (2004 р.).

Электронная версия книги Ю.И.Посудина «Биофизик С.Чахотин» подготовлена в Электронном издательстве «Аналитическая микроскопия» (<http://cam.psn.ru>) под редакцией проф.

А.Ю.Буданцева

(рег. № издательства в Министерстве РФ по делам печати, телерадиовещания и средств массовой информации Эл №6072 от 4 февраля 2002 г.,)

Техническая работа: редактор 1 категории Т.М.Бондарь

© Электронное издательство “Аналитическая микроскопия”



С.С. Чахотин в последние годы жизни



*Сергей Степанович
Чахотин.*

Портрет С.С. Чахотина (рисунок Г.И. Ржимовского)

Содержание

ПРЕДИСЛОВИЕ
ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ БИОГРАФИИ
НАУЧНАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ

I. МИКРОМАНИПУЛЯЦИОННАЯ ТЕХНИКА

Выделение и перенос клеток
Сжатие и иммобилизация
Операционные камеры
Прокалывание микрообъектов
Послеоперационные камеры
Микрофиксатор
Микрокамера с циркуляцией газа
Микроперфузор
Микротрансплантатор
Микровытягивание клеток
Капиллярные камеры
Камера испарения
Приспособление для измерения дыхания
Приспособление для заполнения капилляра
Приспособление для термоэлектрических опытов
Метод микрокапель

II. УЛЬТРАФИОЛЕТОВОЕ МИКРООБЛУЧЕНИЕ КЛЕТОК

Экспериментальная техника
Методика микрооблучения
Результата микрооблучения клеток

РЕАЛИЗАЦИЯ ИДЕЙ С. ЧАХОТИНА В НАШЕ ВРЕМЯ
ЗАКЛЮЧЕНИЕ

БИБЛИОГРАФИЯ ТРУДОВ С. С. ЧАХОТИНА

ИМЕННОЙ УКАЗАТЕЛЬ

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

ПРЕДИСЛОВИЕ

Бурное развитие науки, которым ознаменовалось начало XX-го столетия, стимулировало появление новых экспериментальных и методических подходов к исследованию биологических объектов. Открытие явления радиоактивности, природы рентгеновского излучения, развитие квантовой теории - все это позволило подойти с новых позиций к вопросам изучения процессов жизнедеятельности живых организмов.

В свете этих преобразований в науке, в том числе и на стыке различных дисциплин, особенно яркими представляются жизнь и научная деятельность Сергея Степановича Чахотина - выдающегося биофизика, неутомимого новатора, впервые использовавшего сфокусированное ультрафиолетовое излучение для воздействия на клетку, разработавшего серию уникальных приборов для работы над микрообъектами, заложившего основы целого ряда приемов экспериментальной цитологии, эмбриологии, физиологии. С именем этого ученого связаны успехи современной биофизики, особенно таких ее направлений, как лазерная фотобиология, радиобиология, электрофизиология. Именно о нем писал великий Альберт Эйнштейн: "Я знаю лично профессора Чахотина как очень серьезного ученого, преследовавшего свои научные цели с энергией и не падая духом, несмотря на очень большие внешние помехи».

К сожалению, деятельность С.Чахотина не получила должного отражения в нашей научной и общественной литературе. Вот почему появление исследования Ю.И.Посудина, посвященного освещению основных этапов жизненного пути и творческой деятельности Сергея Чахотина, можно только приветствовать.

Т.М.ТУРПАЕВ, член-корреспондент РАН

*«... Люблю я мирные ряды
лабораторных ламп зеленых,
и пестроту таблиц мудреных,
и блеск приборов колдовской.
И углубляться день-деньской
в колодец светлый микроскопа...»*

(В.Набоков, "Университетская поэма", 1927 г.)

ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ БИОГРАФИИ

Сергей Степанович Чахотин родился 13 сентября 1883 г. в Константинополе в семье российского консула Степана Ивановича Чахотина. В десятилетнем возрасте он вместе с родителями переезжает в Одессу, где учится в Третьей гимназии. С 1899 по 1900 год находится из-за болезни в Италии. После окончания гимназии с золотой медалью в 1901 г. поступает в Московский университет на медицинский факультет. Через год за участие в студенческих выступлениях был арестован. Вот как сам С.Чахотин описывает этот период в предисловии к книге Л.В.Боброва "Тени невидимого света" (М., Атомиздат, 1964 г.): "Исключенный из Московского университета, я выбрал по совету А.Ф.Иоффе для продолжения учебы Мюнхенский университет, в котором гремела тогда слава Рентгена - прошло 6 лет со времени открытия им X-лучей. На его лекциях громадная аудитория была всегда переполненной". И далее: "именно Рентгену я обязан тем, что исследовательский дух, царивший в его лаборатории, обострил во мне, биологе, интерес к физике и привел к открытию принципа и разработке методики микропучка ультрафиолетовых лучей как средства микроопераций над клетками".

В Германии Чахотин учится на медицинском и естественно-научном факультетах в Берлине, Мюнхене, Гейдельберге, специализируясь по физике, химии, зоологии, физиологии. Среди учителей его, кроме В.К.Рентгена, который по словам Чахотина, «...был, можно сказать, самым честным, самым безукоризненным человеком...» нужно назвать химика А.Байера, занимавшегося проблемами синтеза индиго, изучением соединений группы мочевой кислоты и ацетилена, устойчивости различных циклических соединений углерода, свойств непредельных соединений (в 1905 г. Байеру была присвоена Нобелевская премия); биохимика А.Косселя, открывшего в 1896 г. гистидин, исследователя протаминов и гистонов, лауреата Нобелевской премии 1910 г.; братьев Гертвигов - биолога Оскара, автора трудов по морфологии беспозвоночных, цитологии и эмбриологии, применившего новые экспериментальные методы в эмбриологии, и Рихарда, зоолога и эмбриолога, сформулировавшего закономерности объемных соотношений ядра и протоплазмы; Т.Энгельманна, занимавшегося вопросами физиологии нервной и мышечной систем, зрения, сердца. Эти ученые, использовавшие новаторские методы в своей деятельности, несомненно влияли на формирование научного мировоззрения С.Чахотина.

В 1907 г. С.Чахотин окончил Гейдельбергский университет с высшим отличием ("summa cum laude"), защитив диссертацию "Die Statocyste der Heteropoden", посвященную исследованию структуры и физиологии органов равновесия у киленогих моллюсков. За эту работу автору присваивают ученую степень доктора философии.

После учебы в Германии С.Чахотин работает ассистентом в Мессинском

университете (Италия), проводит исследования на морских биологических станциях в Виллафранке, Триесте, Неаполе, Гельголанде, Монако и др. В 1908 г., во время Мессинского землетрясения, в возрасте 25 лет, был заживо погребен под развалинами обвалившегося дома и только через 12 часов освобожден.

После возвращения в Одессу О.Чахотин работает в университете, после чего опять едет в Гейдельберг, где занимается проблемами зоологии (проф. О.Бючли) и онкологии (проф.В.Черни). В 1912 г. молодого ученого приглашает И.П.Павлов - знаменитый физиолог, сочетавший в себе способности и к теоретическому анализу, и к экспериментальной деятельности. Создав из своих учеников и последователей научную школу, И.П.Павлов писал: "... Если я возбуждал, направлял и концентрировал нашу общую работу, то в свою очередь сам постоянно находился под влиянием наблюдательности и идейности моих сотрудников...». Работая в должности ассистента в Институте физиологии с 1912 по 1918 год, С.Чахотин реорганизует физиологическую лабораторию. В этот же период он несколько раз посещает Виллафранку и Неаполь с целью научных исследований.

Начинается первая мировая война. С целью изучения потребностей промышленности в минеральном сырье и обнаружения месторождения запасов руды создается Комитет военно-технической помощи, в рамках которого была организована комиссия сырья и химических материалов. Руководит комитетом А.В.Ферсман, выдающийся геохимик и минералог. Активное участие в работе Комитета принимает и С.Чахотин. В этот период ученый примыкает к Г.В.Плеханову, под руководством которого в 1914 т. возникает группа оборонцев "Единство". Это группа поддерживает Временное правительство с его призывами «войны до победного конца".

В 1918 г. С.Чахотин уезжает на Дон, в Добровольческую армию, где руководит отделом пропаганды "Осваг". Осенью 1919 г. он уезжает за границу. С этого момента начинается самый длительный период эмиграции ученого.

Он возвращается в научной деятельности, начав работать в Пастеровском институте (Париж), а потом Океанографическом музее Монако, на зоологической морской станции в Виллафранке. В то же время С.Чахотин пытается дать свою политическую оценку роли российской интеллигенции в происходящих событиях. В своей статье "В Каноссу" он пишет: "Итак, мы идем в Каноссу. т.е. признаем, что проиграли игру, что шли неверным путем, что поступки и расчеты наши были ошибочны". Статья предназначалась для сборника "Смена всех", который наряду с газетой "Накануне" и другими печатными изданиями отражал взгляды, присущих части русской интеллигенции в двадцатых годах. С газетой "Накануне", выходявшей с марта 1922 г. по июнь 1924 г., сотрудничали многие выдающиеся литераторы: М.Булгаков, В.Катаев, Е.Петров, К.Федин, Вл.Лидин, О.Мандельштам. В редакционную коллегию газеты входил С.Чахотин, литературное приложение редактирует А.Толстой. В Москве в Большом Гнездиловском переулке помещается московское отделение редакции "Накануне".

В 1920 г. С.Чахотин возглавляет отдел в Институте общей патологии в Загребе, а через год становится профессором местного университета. Сложные взаимоотношения ученого с русской эмиграцией вынуждают его через год переехать в Италию. Здесь он участвует в работе Генуэзской конференции, освещая ее работу в газете "Накануне". На конференции С.Чахотин знакомится с Г.В.Чичериним, Л.Б.Красиным, В.В.Воровским, представляющими Советское государство при обсуждении экономических и финансовых вопросов. В этот период Я.Б.Красин приглашает С.Чахотина принять участие в организации советского торгпредства в Берлине. В 1922 г. С.Чахотин получает советское гражданство. Одновременно он является заграничным сотрудником Народного комиссариата Рабоче-крестьянской инспекции.

Не замыкаясь в рамках сугубо научной деятельности, С.Чахотин пишет работы, посвященные научной организации труда: "Организация. Принципы и методы промышленности, торговли, общей администрации и политики" (Москва, 1923), "Европейская литература по научной организации труда" (Москва, 1924), "Рациональная организация научного исследования" (Париж, 1938) и др.

Из-за тяжелой болезни в 1927 г. С.Чахотин уезжает в Геную, где работает в Фармакологическом институте Университета, занимаясь проблемами онкологии. В 1930 году по предложению Альберта Эйнштейна ему присуждается премия Исследовательской корпорации (Research Corporation); в этом же году он возвращается в Германию в Гейдельбергский Институт медицинских исследований. Данный период биографии ученого совпадает с приходом гитлеровской клики к власти. Не оставаясь безучастным к усилению фашизма в Германии, С.Чахотин становится участником антигитлеровского движения, возглавляя пропагандистскую работу в движении "Железного фронта". С приходом Гитлера к власти С.Чахотин вынужден переехать в Данию, где работает в Институте общей патологии. В 1934 году судьба забрасывает С.Чахотина в Париж. Там он занимается научной деятельностью в Институте эволюции в Профилактическом институте, в исследовательской лаборатории госпиталя "Леопольд Беллан", в Институте физико-химической биологии. Основными проблемами, с которыми ученый связывает свою научную деятельность, является микрооблучение клетки, изучение условных рефлексов по И.П.Павлову у одноклеточных микроорганизмов, этиология рака.

Весомым вкладом в борьбу с фашизмом стала книга С.Чахотина «Le vio des foules per la politique» («Психическое насилие над массами путем политической пропаганды»), которую он написал в 1939 году. (рис. 1). Выход книги был вызван возрастанием опасности со стороны пришедших к власти фашистских режимов в Италии и Германии (рис. 2). С.Чахотин, анализируя развитие человека в процессе эволюции,

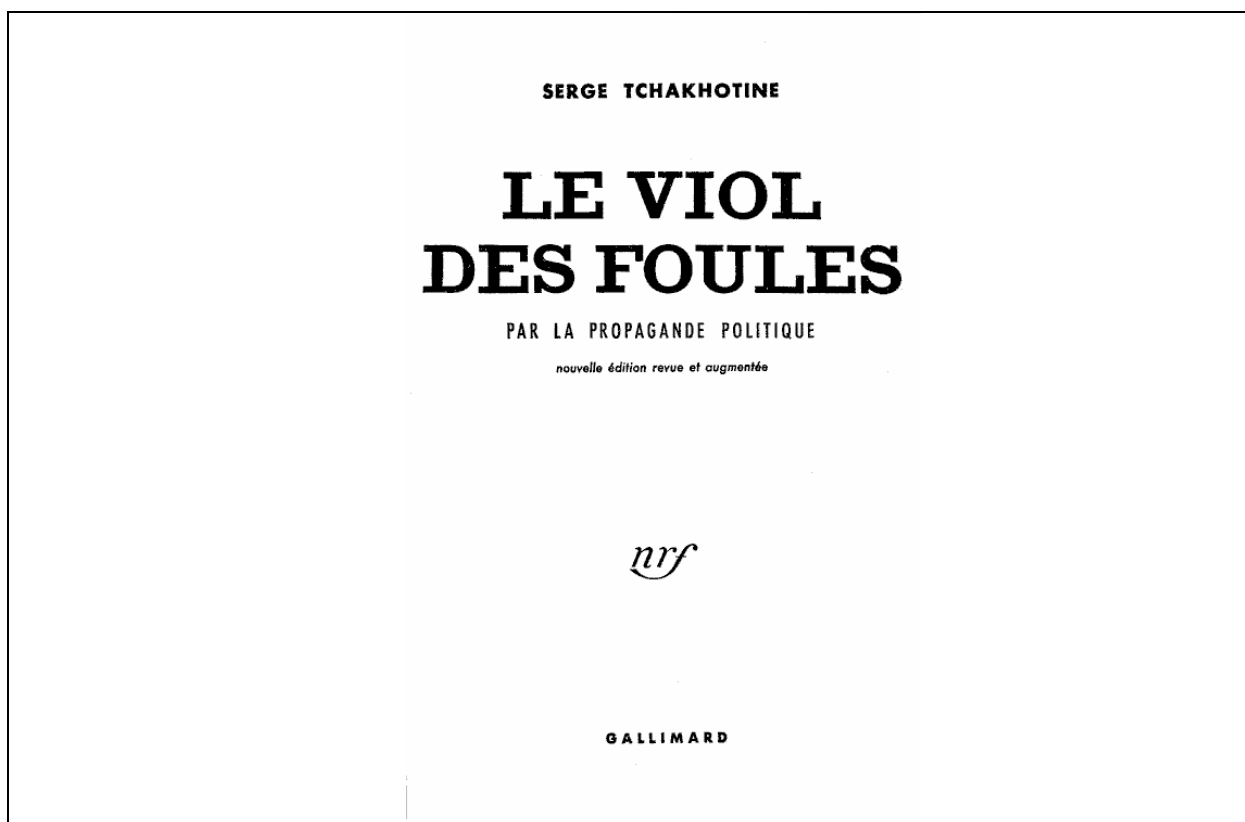


Рис. 1. Титульный лист книги С.Чахотина "Психическое насилие над массами" (1939 г.)

SERGE TCHAKHOTINE
LE VIOL DES FOULES
par la propagande politique

Le public français, si instinctivement hostile à ce que la propagande des états totalitaires a d'abêtissant et de mécanique, s'est étonné de voir les résultats qu'elle obtenait avec certitude, en atteignant précisément dans presque toutes les occasions le but qu'elle s'était proposé.

Le professeur Tchakhotine a voulu analyser méthodiquement les raisons de ce succès qui s'est si peu démenti, et développer les lois psychologiques qui régissent la docilité de certains peuples aux injonctions de leurs pasteurs. Pour lui l'homme de la foule est soumis à des impulsions affectives très primitives, qu'on peut classer dans quatre grandes catégories génératrices de tous les comportements instinctifs. Pavlov a étudié, dans des expériences connues de tous, les mécanismes d'associations d'idées qui provoquent ou suppriment les réactions causées par ces impulsions.

On peut donc en jouant (consciemment ou non) des instincts de conservation comme de reproduction de l'homme noyé au sein de la foule, obtenir de la foule elle-même, et même des masses humaines en général, toutes les réactions que l'on désire pourvu que le sujet soit convenablement hypnotisé, c'est-à-dire traité selon les préceptes de la nouvelle psychologie objective, et que ses impulsions soient guidées dans le sens qui convient le mieux à son niveau intellectuel, social, physique, etc..

A l'appui de cette théorie dont les adversaires du totalitarisme d'où qu'il vienne pourraient bien faire leur profit, l'auteur cite l'exemple de la lutte menée grâce à l'application méthodique d'associations d'idées par les socialistes allemands contre les nazis. Et c'est parce qu'ils n'osèrent pas généraliser ces méthodes, à leur gré trop primitives, que les sociaux-démocrates furent à la fin anéantis, malgré les premiers succès acquis dans ce domaine.

L'auteur exprime, pour terminer, l'espoir et aussi la certitude que les Nations qui veulent s'opposer aux ravages causés dans leur sein même par des procédés dont la clé leur est aujourd'hui offerte, sauront trouver l'antidote (homéopathique si l'on peut dire) à ce nouveau poison des temps modernes : le viol psychique des masses par la propagande politique.

L'édition française de ce livre, détruite par les nazis pendant l'occupation, a eu un succès notable à l'étranger : plusieurs éditions anglaises, américaines et canadiennes en témoignent. H. G. Wells écrivit à propos de cet ouvrage que, selon lui, ce serait « le plus lumineux et complet exposé de la psychologie sociale contemporaine. Ce livre traite le sujet de tous les côtés et à fond. Il analyse le processus historique à la lumière d'une critique des plus modernes, et le diagnostic des événements que nous vivons le mène à l'établissement convaincant des mesures à prendre. Je suis fier d'affirmer combien je suis en accord avec les idées exposées dans ce livre aussi magistral que moderne ».

Après la guerre une nouvelle édition française s'imposa. Elle paraît donc totalement revue et augmentée. Depuis la première édition en effet, la psychologie objective, base de ce livre, a accumulé une foule de nouveaux faits de première importance et les événements politiques ont changé notablement la face du monde. L'auteur a cru utile de munir cette nouvelle édition d'une vaste bibliographie, d'illustrations qui facilitent la compréhension des faits et des lois scientifiques énoncés, d'un copieux index des auteurs cités et des problèmes étudiés.

1.350 fr. + T. L.

пытается дать классификацию инстинктов толпы и объяснить, чем в тот или иной исторический отрезок обуславливалась поддержка диктаторов (рис. 3).

В этот период времени С.Чахотина посещают академики Л.А.Орбели (основоположник эволюционной физиологии), А.А.Богомолец (патофизиолог), М.П.Кончаловский (терапевт), проявившие живой интерес к новым методам исследований С.Чахотина. Ученый много работает, выступает на многочисленных конференциях по вопросам физиологии, цитологии, онкологии. Приглашается с научными докладами в Сорбонну (Париж), в Общество имени Фарадея (Лондон). Его научные успехи отмечаются премиями Французской Академии наук (1936 г.) и Парижской медицинской академии (1938 г.).

Политическая активность С.Чахотина не остается без внимания фашистов, оккупировавших Париж. В 1941 г. его как советского гражданина, арестовывают и заключают в концлагерь в Компьене, где он проводит семь месяцев. Лишь только вмешательство хорошо знавших С.Чахотина немецких ученых позволило ему приобрести



Рис.3. Иллюстрация к книге С.Чахотина "Психическое насилие над массами"

свободу. После освобождения Парижа в 1944 г. С.Чахотин читает лекции на курсах

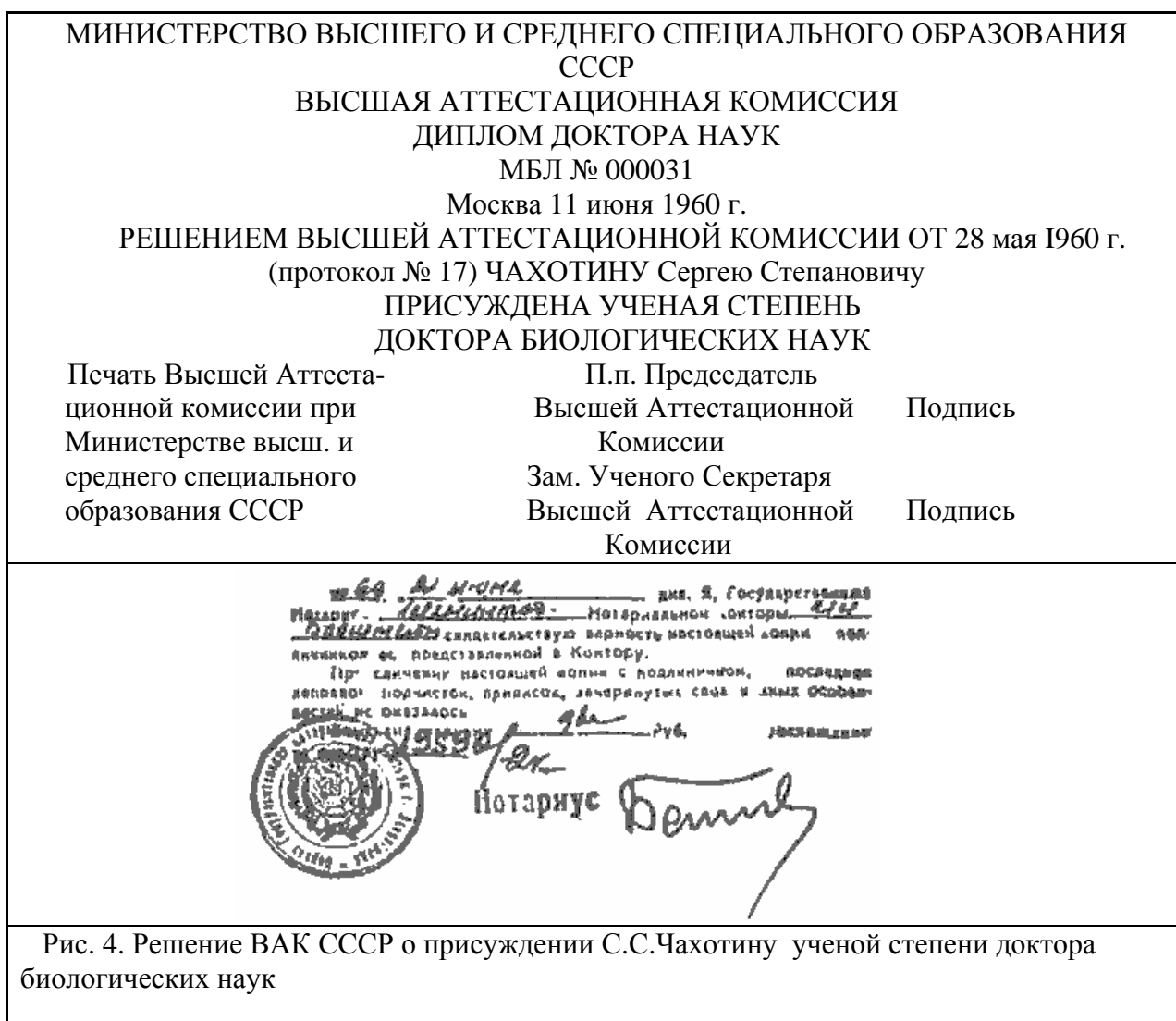
активистов "Советского патриота", организывает научно-политическое общество «Science-Action-Liberation» руководит проведением Конференция культурных сил. Основной задачей этих прогрессивных движений было распространение правильных, неискаженных сведений о СССР, борьба против угрозы третьей мировой войны и возрождавшегося фашизма. Во время своей работы в Институте физико-химической биологии С.Чохотин активно участвует в организации первого Международного Съезда сторонников мира в 1949 г.

В 1955 г. он переезжает в Италию, сначала в Геную (Фармакологический институт Университета), затем в Рим (Фармакологический институт, Высший институт здравоохранения, Институт общей физиологии) где С.Чохотин работает вплоть до 1958 г.

В 1958 г. С.Чохотин возвращается на родину. Передо мною копия приказа № 49 по Институту цитологии АН СССР (г. Ленинград) от 18 апреля 1958 г. : «Чохотин Сергей Степанович зачисляется на должность старшего научного сотрудника лаборатории цитологических основ воспроизведения и развития с окладом 3000 руб. в месяц с 18 апреля с.г. ...Основание: Распоряжение Президиума АН СССР № 2-2865 от 24 декабря 1957 г." (И.о.директора профессор Ю.И.Полянский).

Распоряжение Президиума АН СССР подписано главным ученым секретарем, академиком А.В.Топчиевым.

В это же время встает вопрос о возможности присуждения С.Чохотину ученой степени доктора биологических наук по совокупности трудов (без защиты диссертации).



В отзывах трех рецензентов – С.Романова, И.Соколова и В.Парибока дается блестящая характеристика научной деятельности ученого. Решением ВАК от 28 мая 1960 г. С.Чахотину присуждается ученая степень доктора биологических наук (рис. 4). Продолжая работать в области ультрафиолетового облучения клетки, ученый выступает с докладами в Институте цитологии АН СССР, Институте микробиологии АН СССР, на

VI-ом Всесоюзном съезде анатомов, гистологов и эмбриологов в Киеве (1958 г.), на Съезде физиологов в Минске (1959 г.) и Обществе физиологов в Ленинграде (1959 г.), в Институтах цитологии и зоологии (Ленинград), Морфологии животных (Москва), в МГУ, в Институте экспериментальной патологии и терапии (Сухуми). Демонстрирует свои методы и приборы на Международном симпозиуме по радиобиологии (Москва, 1960 г.).

Распоряжением по Институту цитологии АН СССР от 29 октября 1960 г. С.Чахотин переводится в Москву, в Институт биофизики АН СССР, где он работает до 1967 г. Нельзя сказать, что научный путь С.Чахотина в стенах этого учреждения был усыпан розами. Когда он находился за границей, его работы привлекали внимание многих ученых, в том числе и приезжавших из Советского Союза. Здесь же, за все восемь лет пребывания ученого в институте администрация так и не удосужилась хоть раз посетить его лабораторию, поинтересоваться проведением исследований. Были и проблемы материально-технического обеспечения, и отказы в поездках на международные конференции.

Все это привело к тому, что с 16 сентября 1967 г. С.Чахотин зачисляется в порядке перевода в Институт биологии развития АН СССР, где работает в должности научного сотрудника, а с 1 июля 1970 г. - научным консультантом вплоть до самой смерти, которая настигла ученого 24 декабря 1973 г.

У Сергея Степановича от трех браков (с Эммой Вильгельмовной Гааз, Серафимой Никитичной Омелаевой и Анной Марковной Свенчанской) остались сыновья Сергей (1906 г.р.), Игорь (1911 г.р.), Вениамин (1917 г.р.), Евгений (1922 г.р.), Андрей (1939 г.р.) и Петр (1943 г.р.).

Согласно соглашению, заключенному между сыновьями, прах отца был захоронен на острове Корсика, в селении Каржез.

НАУЧНАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ

Любое научное исследование начинается с постановки проблемы, выбора и обоснования методов ее решения. В этом плане следует отметить, что начало научной деятельности С.Чахотина совпало с развитием представлений о биологической клетке как элементарной биологической единице, в пределах которой совершается основная ее жизнедеятельность. Нельзя не отметить при этом несомненного влияния на научное мировоззрение ученого таких новаторов, использовавших оригинальные экспериментальные приемы в своих исследованиях, как В.К.Рентген, О.Гертвиг, Т.Энгельманн, И.П.Павлов. Представляя С.Чахотина к присвоения ученой степени доктора биологических наук, один из рецензентов С.Романов пишет: "Основные постулаты о том, что клетка является элементарной морфологической единицей живой материи и что законы физики и химии лежат в основе жизнедеятельности живой клетки, стали методологической основой научного мышления большинства биологов. Эта строго научная материалистическая методология была положена С.С.Чахотиным в основу всей его последующей деятельности. Проблему, избранную им для исследования, можно формулировать так: "Физико-химические основы поведения клеток". Выбор этой проблемы свидетельствует об эрудиции автора, о его глубоком понимании актуальных проблем современной биологии".

Свои ранние исследования С. Чахотин посвящает изучению биоэлектрических токов у позвоночных. Автор не только рассматривает природу этих токов, но и ставит вопрос о связи биоэлектрических явлений с морфологической структурой тканей.

Особое внимание уделяет ученый проблеме терапии злокачественных опухолей. Ему удается установить связь восприимчивости мышечной ткани к раку с лейкоцитарной формулой крови. Работая в Гейдельберге (1912 г.) и в Генуе (1928-1930 гг.), он публикует работы о роли лейкоцитоза при раке лабораторных животных, вызванном канцерогенными веществами. Нарушение гликолитического процесса части развивающегося яйца морского ежа позволило С. Чахотину инициировать явления, сходные с малигнизацией тканей. За свою работу "Клеточный микроскоп и проблема рака" ученый удостоивается в 1936 г. премии Парижской медицинской академии.

Но основной сферой научной деятельности является разработка методов и средств микроманипулирования с отдельными клетками, а также микрооблучение клеток и их органелл сфокусированным ультрафиолетовым излучением.

Говоря о необходимости развития экспериментальной цитологии, сам Чахотин признает, что и до него имели место попытки ряда ученых исследовать отдельные клетки (Balbiani E.G., 1888; Bataillon E., 1910; Chabry L., 1887; Maupas E., 1888; Roux W., 1895; Verworn M., 1889 и др.). Однако данные исследователи использовали довольно крупные объекты – яйца лягушек и других амфибий. В ряде случаев господствовал подход, основанный на исследовании закономерностей, присущих однородным массам клеток с последующей экстраполяцией результатов на отдельную клетку. Можно отметить и метод дифференциального центрифугирования, при котором происходит разрушение клеток и распределение содержимого в соответствии с удельным весом по фракциям с последующим изучением свойств отдельных органелл – ядер, митохондрий, микросом и т.д.

С. Чахотин, тем не менее, приходит уже в своих ранних работах по исследованию биоэлектрических токов у беспозвоночных и по изучению физиологии органа равновесия моллюска *Pterotrachea* к выводу о необходимости изучения процессов жизнедеятельности живых организмов на основе экспериментальных подходов, применяемых к изолированным клеткам многоклеточного организма или к одноклеточным организмам.

Начиная с 1912 г. С. Чахотин разрабатывает целую серию микроманипуляторов, микрооператоров и других устройств для обеспечения механических приемов и операций над клеткой под микроскопом. При этом исследователем была учтена необходимость перемещения клеток, их фиксации, иммобилизации, извлечения, помещения в различные сосуды. Рассмотрим более подробно особенности предложенной С. Чахотиным микротехники.

1. МИКРОМАНИПУЛЯЦИОННАЯ ТЕХНИКА

Выделение и перенос клеток

При необходимости изоляции подвижных клеток (водорослей, инфузорий) предлагается использовать длинные капилляры с воронкообразным концом. Этот конец подводят к объекту и втягивают его с помощью резиновой пипетки. Другой метод предусматривает использование стеклянного мундштука, который исследователь держит во рту и который связан посредством резиновой трубки с капиллярообразным концом. При работе с неподвижными объектами (например, яйцеклетками) используют метод прецизионной микрокапиллярной пипетки (сам Чахотин дал ей название "мипетки").

Техника изготовления этой пипетки представлена на рис. 5 (в разделах 1 и 2 представлены рисунки, заимствованные из работ С.С. Чахотина). Стеклообразную трубку длиной около 15 см и диаметром 5 мм вытягивают в длину над огнем так, чтобы образовался капилляр длиной 20 см и диаметром от 0,5 до 0,7 мм (а). Обрезают капилляр и оплавливают отрезанный конец до образования шарика (б). После этого шарик выдувают до появления пузырька, предварительно одев на трубку резиновый шланг (с). Вытягивают капилляр над огнем и обламывают его (d). Пузырек нагревают (е), воздух в нем расширяется. Конец капилляра опускают в подготовленную жидкость; воздух при охлаждении сжимается и засасывает жидкость (f). На пипетку одевают кусок пробки для теплоизоляции (g) и удерживают ее пальцами.

Работают с пипеткой следующим образом. Пробковую пластину удерживают большим и средним пальцем (рис. 6, а), при этом касаясь стеклянного пузырька внутренними поверхностями пальцев. За счет тепла пальцев из капилляра выйдет немного жидкости. Затем конец пипетки погружают в жидкость с исследуемыми объектами и подводят под микроскопом конец капилляра к избранному объекту. Раздвигают пальцы (рис.6, б); воздушный пузырек охлаждается, жидкость всасывается внутрь вместе с объектом. Для извлечения объекта пипетку переносят в другой сосуд и сжимают пальцы. Вместо нагрева рукой автор предлагает использовать электроподогрев с помощью намотанной вокруг капилляра спирали.



Рис. 5. Капиллярная пипетка с воздушным пузырьком (пояснения в тексте)

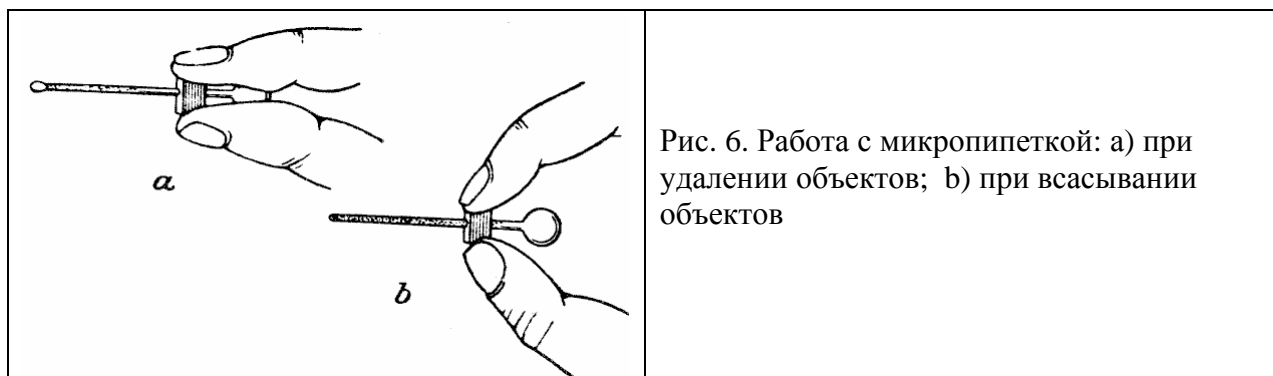


Рис. 6. Работа с микропипеткой: а) при удалении объектов; б) при всасывании объектов

Сжатие и иммобилизация

Некоторые исследователи использовали для иммобилизации подвижных микрообъектов плотные среды, в которых скорость движения организмов существенно замедлялась, или использовали способность организмов на некоторое время оставаться неподвижными при контакте с твердыми объектами (т.н. "сигмотаксис"). С. Чахотин предложил метод иммобилизации микрообъектов с помощью небольшого сжатия. Предложенный ученым микрокомпрессор (рис. 7, а) состоит из латунной пластинки D толщиной 1 мм с отверстием посередине, под которым приклеивают небольшой кусок стеклянной или кварцевой пластины S . С обеих сторон установлены два металлических штыря (рис. 7, б). Вторая латунная пластина D снабжена отверстием большего диаметра, которое закрыто покровным стеклом dg . Пластина оборудована мягкими прокладками f для предотвращения препарата от раздавливания. Два небольших отверстия в пластине соответствуют штырям верхней пластины (рис. 7, в). На основание S с помощью микропипетки наносят каплю воды с клеткой и соединяют верхнюю и нижнюю пластины (рис. 7, в). Весь узел помещают на предметный столик микроскопа (рис. 8); с помощью винтов Sr прижимают обе пластины друг к другу. При этом микроорганизм плавно сжимается и иммобилизуется, оставаясь неповрежденным.

Если вместо покровного стекла на отверстие закрепить небольшую узкую пластинку (рис. 7, d), то техника введения и извлечения клетки существенно упрощается. При этом в приспособление с помощью пипетки вносят каплю воды, располагая конец пипетки между краями отверстия и узкой пластиной. Аналогично вводят и микроорганизм, который располагается под пластиной. Излишек воды убирают. В данном варианте можно

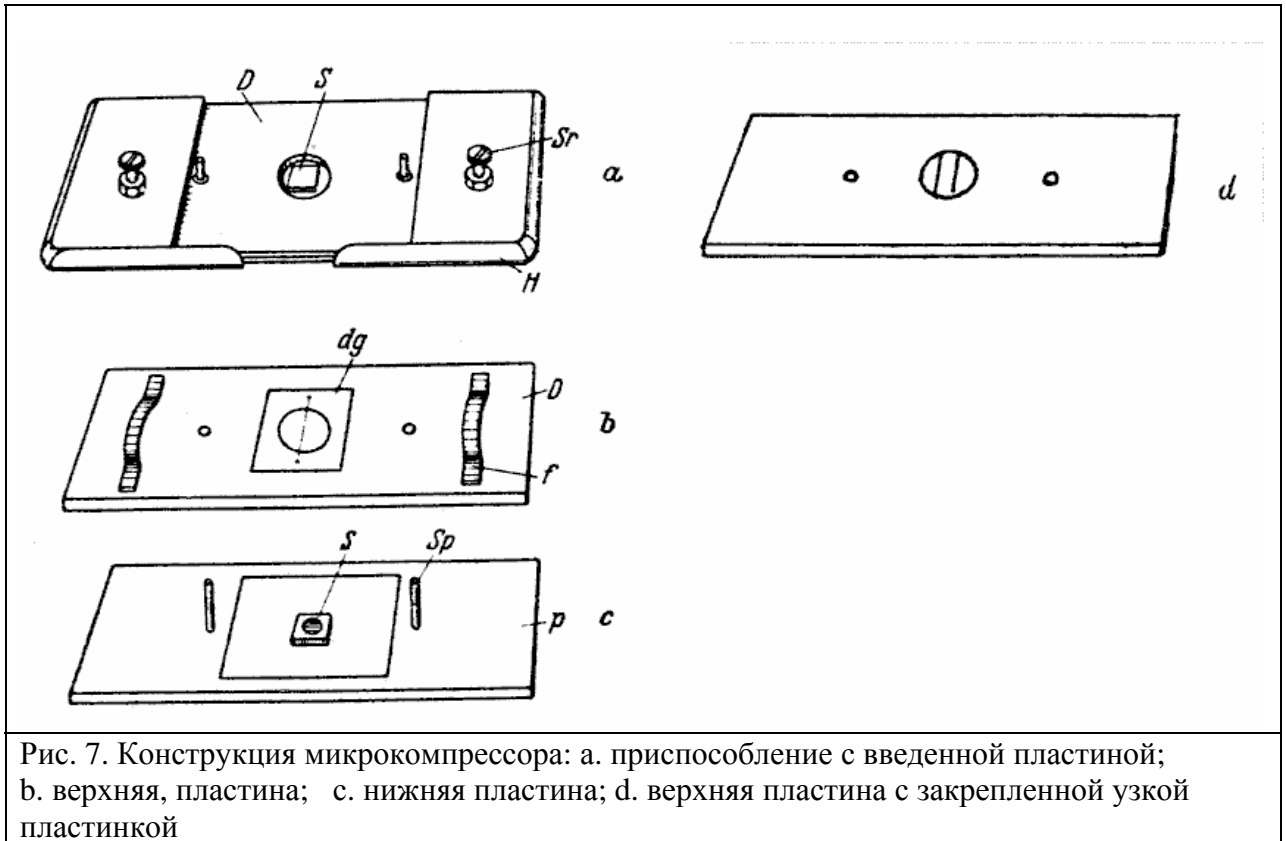


Рис. 7. Конструкция микрокомпрессора: а. приспособление с введенной пластиной; б. верхняя пластина; в. нижняя пластина; д. верхняя пластина с закрепленной узкой пластинкой

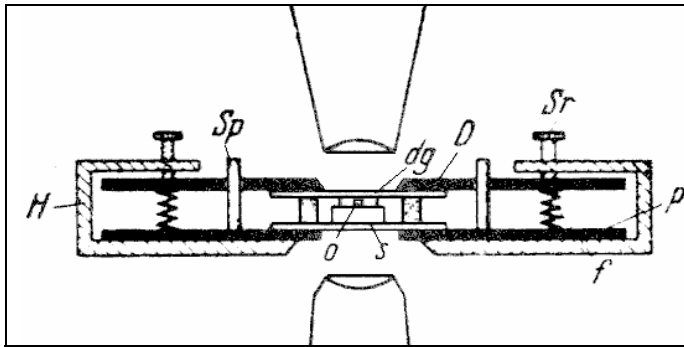


Рис. 8. Размещение микрокомпрессора на предметном столике микроскопа (пояснения в тексте)

совмещать механические, световые, тепловые и химические факторы воздействия на микроорганизмы. Размещая на пластинке волос или тонкую нить, можно обеспечить разрезание клетки. Располагая клетку у края пластинки, можно осуществлять различные микроманипуляции с ней – уколы, электрораздражения и т.д.

Операционные камеры

При работе с неподвижными микрообъектами (яйцами, амебами) не всегда возникает необходимость прижимать исследуемые объекты. В этом случае используют операционные камеры более простой конструкции. Одна из таких камер изображена на рис. 9. Представляет она собой предметное стекло, на котором расположены четыре широких пластины b и четыре более узкие пластины s ; в образованные пустые полости вкладывают две пластины p , создающие при этом прямоугольные камеры. Над обеими камерами располагают длинную пластину q которая прижимается пружиной f . Эти камеры заполняются с помощью пипетки - одна раствором флуоресцеина, другая - жидкостью, в которую попадает объект. Сам объект вводят с помощью микропипетки, свободный конец которой подводят под покровное стекло операционной камеры, а затем приближением ладони к стеклянному пузырьку обеспечивает ввод клетки в камеру (рис. 10). После манипуляций с клеткой вывод ее из камеры осуществляется в обратной последовательности. Сам манипулятор с микропипеткой изображен на рис. 11. На трехгранном основании перемещается рейтер, на котором расположены перпендикулярно направленные салазки SI . На них размещена трубчатая колонка S со штангой St . На штанге закреплена пластина PI с гильзой u и патрубком R , который может выдвигаться и поворачиваться вокруг своей оси. В патрубок вставляется пробка k с манипулятором, состоящим из зажима V , иглой со стеклянной головкой N и пипеткой MI . Данная система позволяет реализовать любые перемещения пипетки относительно операционной камеры.

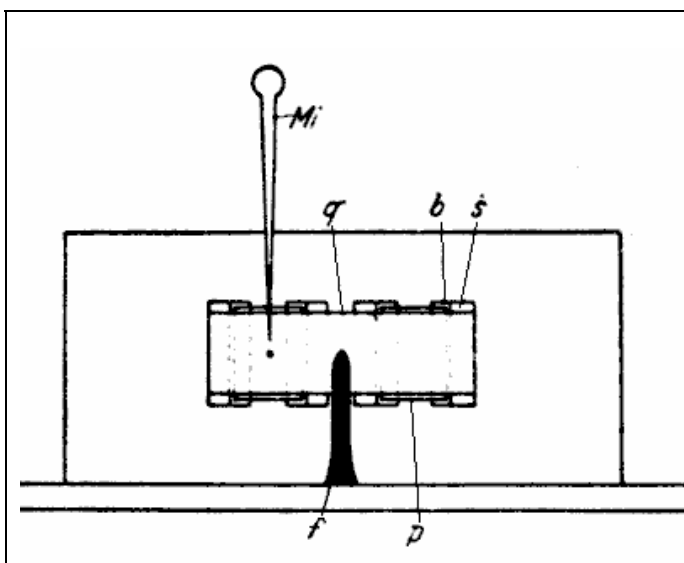


Рис. 9. Операционная каналная камера (пояснения в тексте)

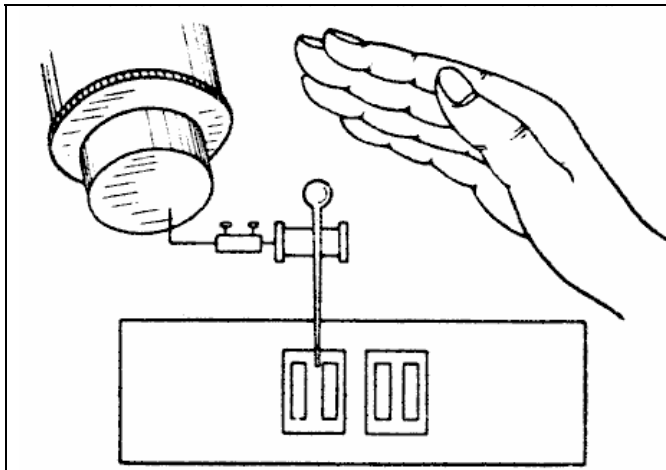


Рис.10. Введение клетки в канал с помощью микропипетки

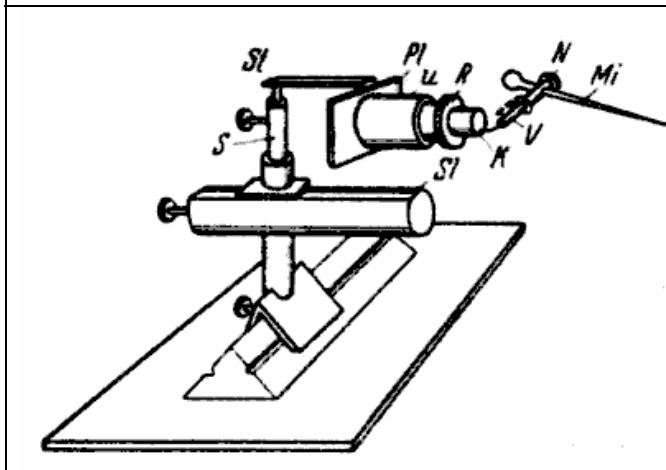


Рис.11. Микроманипулятор с микропипеткой (пояснения в тексте)

Один из вариантов камер представляет собой вырезанное из бумаги кольцо с внешним диаметром 6 мм и внутренним - 4 мм. Кольцо r погружает в расплавленный парафин, охлаждают и располагают на предметном стекле, слегка подогрев последнее (рис. 12).

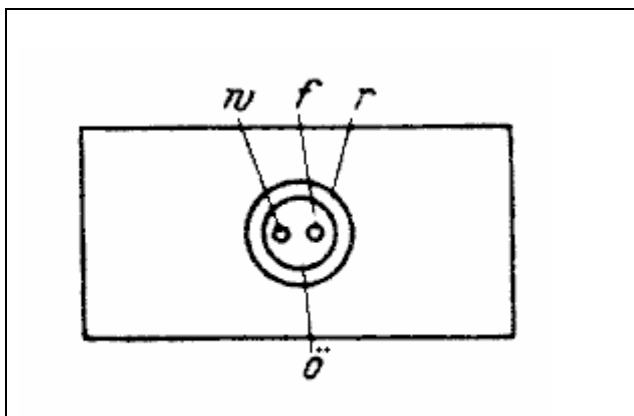
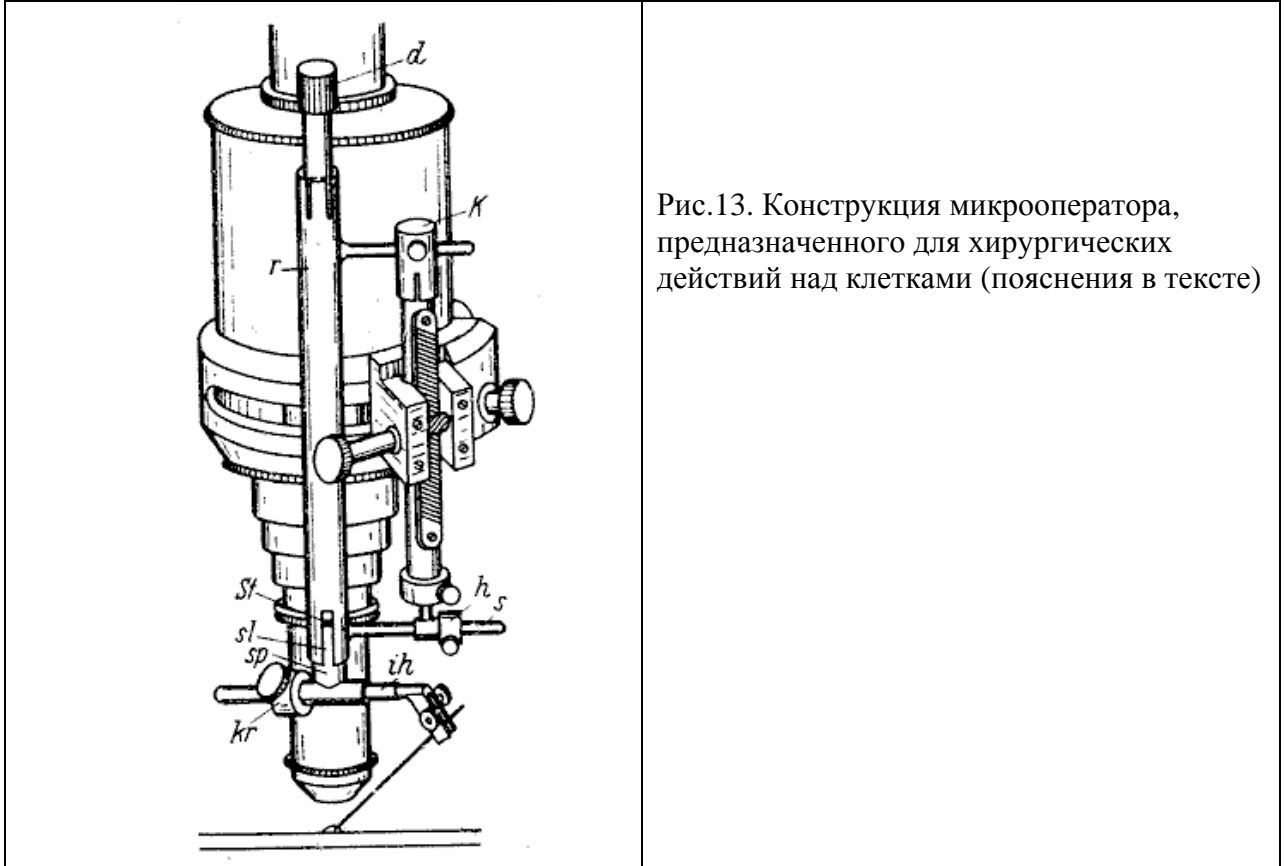


Рис. 12. Операционная камера (пояснения в тексте)

При этом кольцо приклеивается к стеклу. Вводят каплю парафинового масла (o) внутрь кольца. С помощью микропипетки с резиновой трубкой просверливают в слое парафинового масла отверстие, и на дно углубления помещают каплю воды w . В каплю переносят клетку. С помощью второй пипетки вносят каплю флуоресцеина f для удобства ориентации. Преимущество метода заключается в том, что препарат не надо закрывать покровным стеклом - слой парафинового масла и защищает объект от высыхания, и обеспечивает возможность наблюдения за ним.

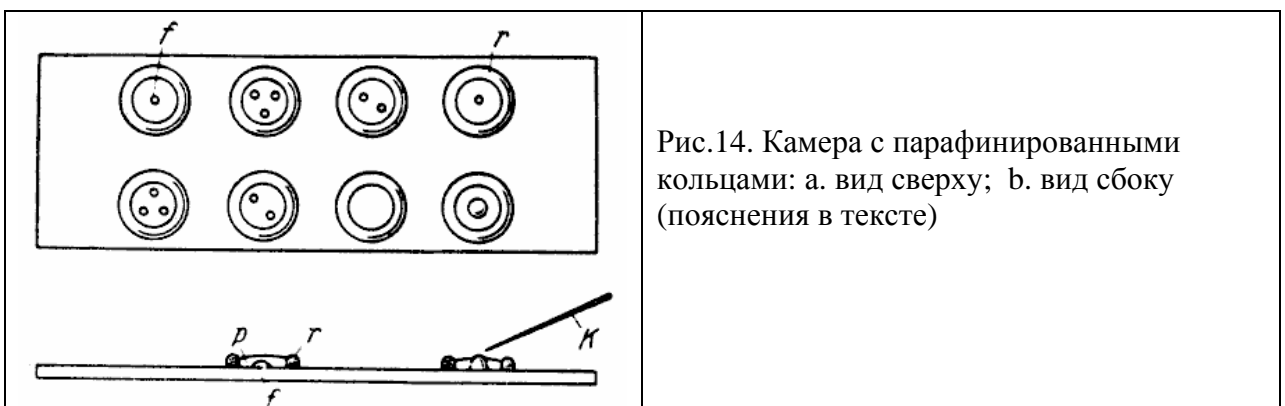
Прокалывание микрообъектов

Конструкция микрооператора, предназначенного для хирургических действий над клетками, изображена на рис. 13. Предварительно, с помощью зубчатой передачи, производится грубая установка инструмента, а затем, вращая головку d и зажимное кольцо Kr , осуществляют точное подведение держателя инструмента ih к объекту, после чего производят операцию.



Послеоперационные камеры

В качестве послеоперационных камер С.Чахотин предлагает использовать несколько (8-10) колец r из парафинированной бумаги, наклеенных на предметное стекло (рис.14,а). На дно таких камер с помощью капиллярных трубок можно помещать парафиновое масло p , в которое вносится капля жидкости f с исследуемой клеткой. Если капля слишком велика и ее поверхность выступает из парафинового масла, прибегают к многократному касания этой капли тонким капилляром K (рис. 14, b).



Еще один вид послеоперационной камеры изображен на рис. 15. На покрывное

стекло p наклеивают парафинированное кольцо r ; в углубление вводят каплю воды T с исследуемой клеткой. Затем покровное стекло переворачивают и устанавливают его углублением с каплей вниз на предметное стекло ot со сферическим углублением d . Для предотвращения испарения капли кольцо приклеивают с помощью парафина g . Вокруг исследуемой капли можно нанести капли K с контрольными клетками.

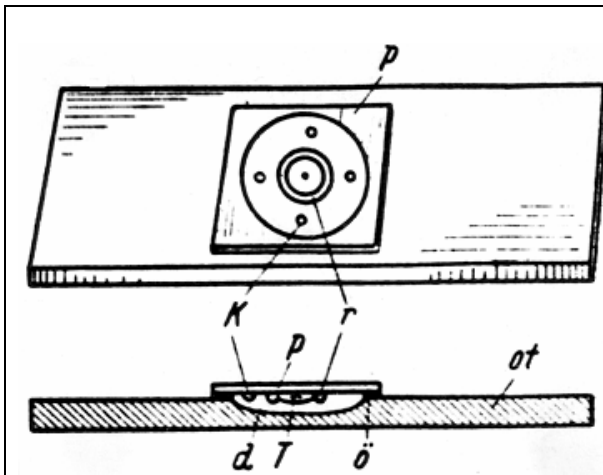


Рис. 15. Камера с подвешенной каплей: а. вид сверху; б. вид сбоку (пояснения в тексте)

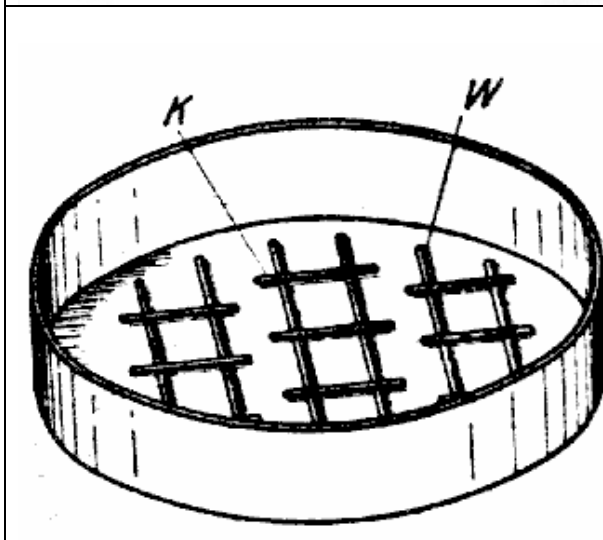


Рис. 16. Капиллярная послеоперационная камера (К- капилляры; W - парафиновые барьеры)

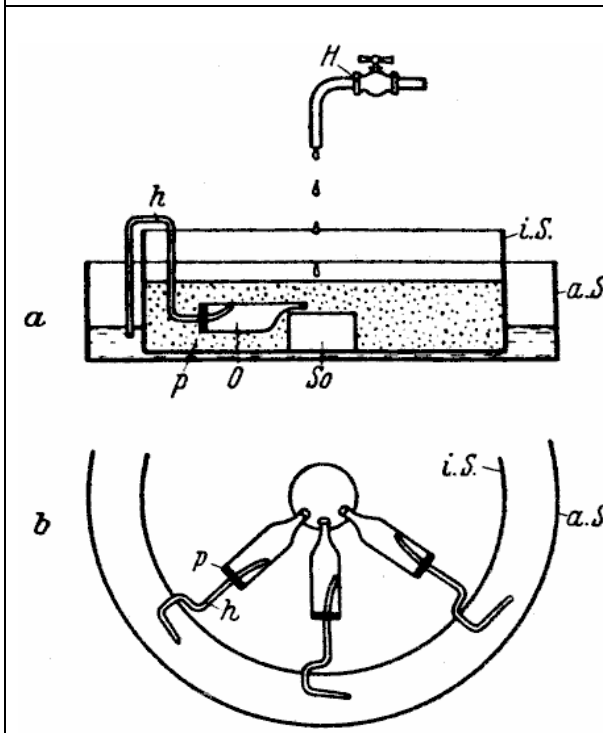


Рис. 17. Послеоперационная камера с обновлением потока среда (пояснения в тексте)

В ряде случаев в такую камеру можно расположить ряд тонких капилляров с клетками (рис. 16).

При необходимости сообщения клетке непрерывной аэрации или обновления воды используется камера следующей конструкции (рис. 17). Две чашки Петри вставляются одна в другую. Во внешней чашке aS находится вода; в середине внутренней чашки iS расположено основание So , на котором покоятся радиально расположенные заостренные стеклянные трубки o . Торцы этих трубок закрыты заглушками p , через которые с помощью капилляров h и притока H жидкости создается разность уровней жидкости во внешней и внутренней чашках. Исследуемый объект подводят к заостренному концу трубки; за счет разности давлений он всасывается и располагается на дне трубки, где его можно наблюдать. Среда при этом непрерывно обновляется.

Микрофиксатор

Данное устройство, представляющее собой комбинацию камеры с углублением в перевернутом виде и микропипетки, предназначено для быстрого закрепления клетки. Конструкция микрофиксатора изображена на рис. 18. Две латунные пластины R размерами 4x8 см располагают одну над другой на расстоянии 5 мм; толщина каждой пластины 1 мм. В нижней пластине имеется отверстие диаметром 20 мм; в верхней выполнено отверстие диаметром 10 мм с прорезью SI шириной 4 мм, которая тянется до края пластины. Слева расположена гильза h со штифтом St , который поддерживает пружинящую трубку t . В последней зафиксированы более тонкая трубка r , которую можно перемещать перпендикулярно штифту. В ней же расположена микропипетка Mi . На верхнюю пластину приклеивают покровное стекло. На нижнюю

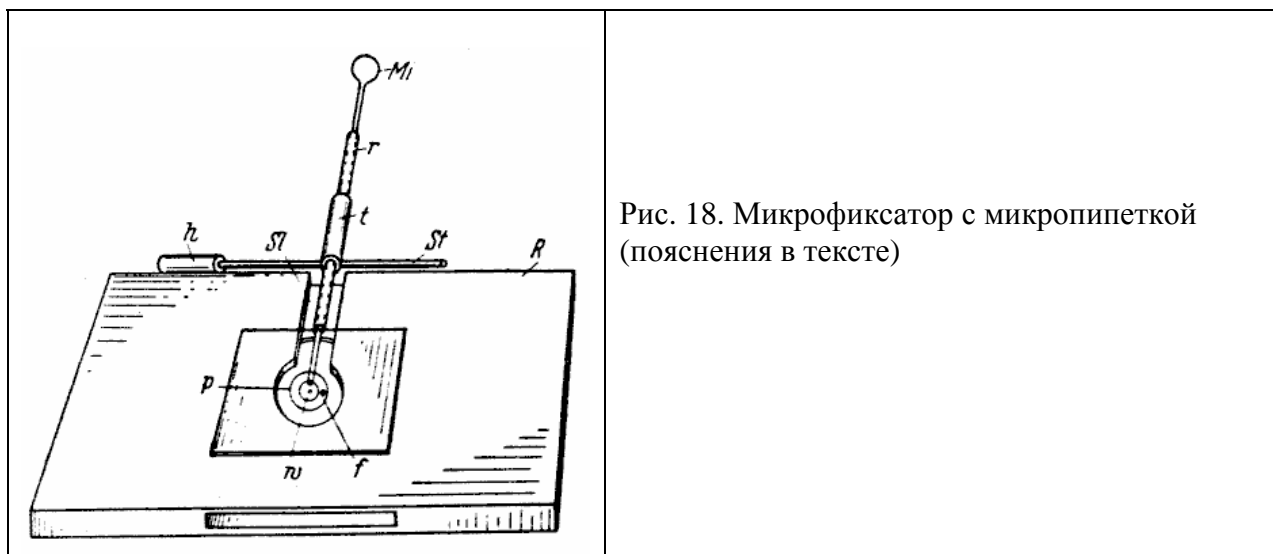


Рис. 18. Микрофиксатор с микропипеткой (пояснения в тексте)

поверхность покровного стекла наносят каплю парафинового масла p , в которую, в свою очередь, помещают каплю воды w с исследуемой клеткой (для этого устройство переворачивают). Пипетка может содержать любой реактив - краситель, яд, среду, электролит и т.д. Для целей калибровки системы в парафиновое масло вводят каплю флуоресцеина f .

Микрокамера с циркуляцией газа

Это устройство предназначено для исследования реакций клеток на внешние физические факторы при различных условиях аэро- и анаэробноза, при изучении влияния газовой среды. Конструкция устройства (рис. 19) состоит из латунной пластины p толщиной 1 мм с отверстием диаметром 15 мм, снабженной двумя

планками l высотой 5 мм. На пластине расположен блок b размерами 30x25x5 мм с отверстием диаметром 10 мм. С этим отверстием связаны трубки r со шлангами g . Трубки проходят через пазы e в планках l .

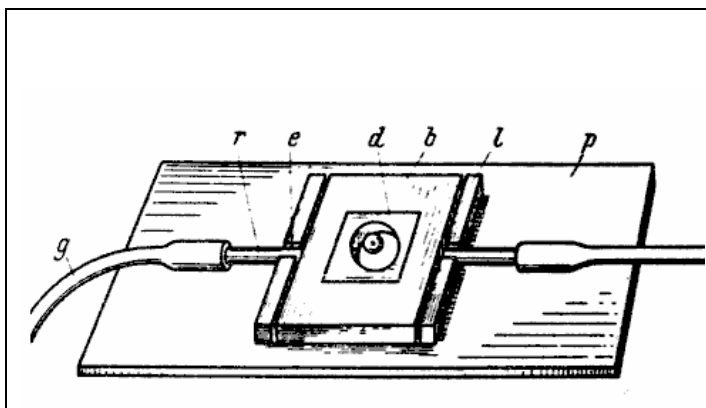


Рис. 19. Микрокамера с циркуляцией газа (пояснения в тексте)

На верхнюю поверхность блока прикрепляют парафином покровное стекло d . Блок переворачивают, нанося на внутреннюю поверхность покровного стекла каплю парафинового масла, в которую помещают каплю воды с исследуемым объектом. После этого блок вновь переворачивают, закрыв при этом отверстие кварцевой пластиной. По шлангам в собранное и подготовленное устройство подают газ (светильный или, при необходимости изменения рН среды, аммиак или хлористый водород).

Микроперфузор

Это устройство позволяет обеспечивать потоки жидкости вокруг исследуемого объекта с целью исследования одновременного воздействия физических и химических факторов. Конструкция устройства (рис. 20) состоит из четырех частей (a-d). Самая нижняя пластина выполнена из латуни (размеры ее 45x90x2 мм (рис. 20, a)). Внутри имеется четырехугольное углубление размерами 27x50x1 мм с отверстием диаметром 15 мм. Справа и слева расположены два резьбовых штифта *St* с резиновыми трубками *g*. Пластина оборудована шарнирами *Sr* со штифтами *S*, гильзой *h* и стержнями *gs*, между которыми располагается полоски фильтровальной бумаги *fp* предназначенные для транспортировки жидкости. Вторая часть устройства состоит из пластины размерами 27x50x1 мм (рис. 20, b), которая входит в углубление первой пластины. В центре второй пластины имеется прямоугольный вырез 5x7 мм, по периметру которого приклеены два стеклянных цоколя *So*. В пластине имеются два отверстия *lo*, соответствующие штифтам первой пластины. Третья пластина (рис. 20, c) имеет размеры 27x50x1 мм; в центре ее выполнен прямоугольный продольный вырез 7x13 мм. Вдоль длинных краев щели располагается планки *le*, на которые помещают кварцевую пластину *q* размерами 5x10 мм.

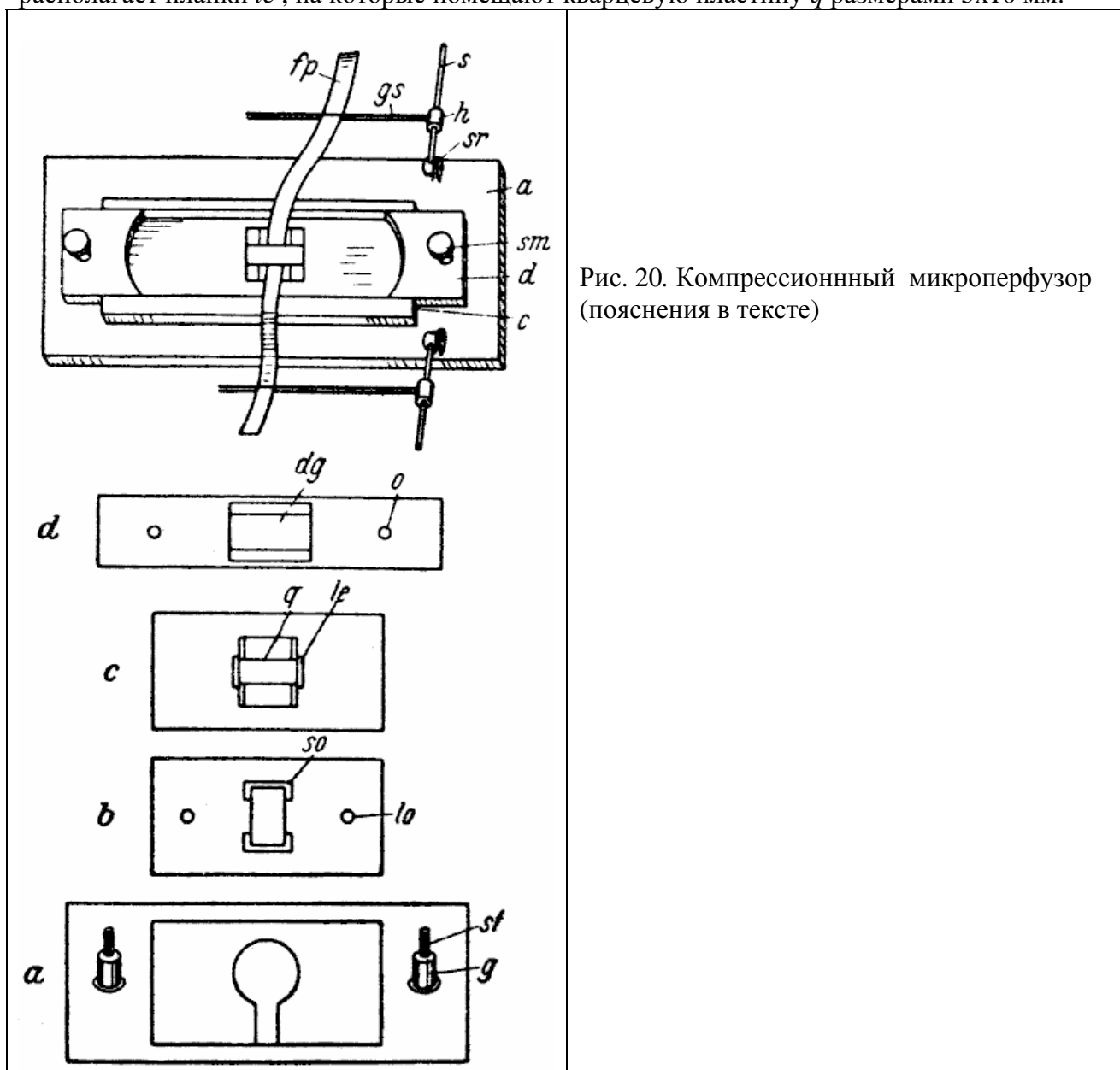


Рис. 20. Компрессионный микроперфузор
(пояснения в тексте)

Наконец, четвертый элемент конструкции (рис, 20, d) представляет собой пластину

размерами 20x80x1 мм. Она оборудована планками высотой 1 мм вдоль прямоугольного выреза 14x13 мм, над которым располагают покрывное стекло *dg*.

На кварцевую пластину третьего элемента конструкции поступает жидкость с исследуемым объектом. "Сэндвич" из четырех элементов собирают, фиксируют с помощью гаек *sm*, соблюдая меры предосторожности с тем, чтобы не раздавить объект. Подавая капли воды или перфузионной жидкости на конец одной из полосок фильтровальной бумаги и используя с другой стороны сухие полоски, обеспечивают поток жидкости вокруг объекта.

Микротрансплантатор

Устройство предназначено для трансплантации клеток, фрагментов яиц и т.д. Состоит из алюминиевого объектодержателя, в середине которого с помощью скоб *K* закреплена кварцевая пластина *q* (рис. 21, а). К ней приклеены три стеклянные пластины: одна из них (*a*) образует канал с подвижной пластиной *d*, а две другие служат в качестве направляющих при перемещении пластины *d*, на которой приклеена еще одна стеклянная пластина, закрывающая канал. Пластина *d* перемещается с помощью штифта *s* и рычага *l* на шарнире *Sr*. Система оборудована стеклянными трубками *r* в каждую из которых вставлена тонкая стеклонить *g* со сферическими утолщениями на конце (рис. 21, б). Другие концы стеклонити механически связаны с рычагами *sl*. Перемещая их, можно добиться прижатия друг к другу двух яйцеклеток *Z*. Место контакта *sb* облучается ультрафиолетовым светом, после чего клетки склеиваются.

Еще один вариант микротрансплантатора изображен на рис. 22. На латунную пластину *P* размерами 60x75x1 мм с отверстием *lc* укладывают вторую пластину *p* размерами 25x75x3 мм так, чтобы обе пластины плотно прилегали друг к другу.

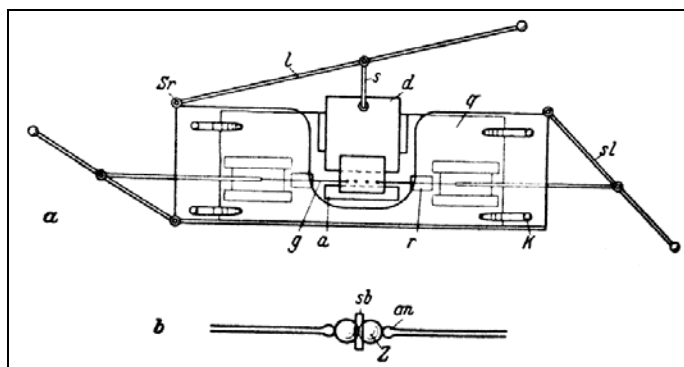


Рис. 21. Прибор для трансплантации клеток (*a* - общий вид сверху); *b* - две яйцеклетки, прижатые в канале перед микрооблучением (пояснения в тексте)

В верхней пластине имеется отверстие диаметром 10 мм, на которое укладывают кварцевую пластину *q* с тонким каналом, образованным приклеенными стеклянными планками. По бокам от канала приклеены короткие стеклянные трубки *r*, служащие направляющими для штифтов *g*. Кроме того, на верхней пластине установлен блок *b* с винтом *sr*, сопряженным со штифтом в направляющей *f*, крючком *h* и резиновым кольцом *gr*. На основной пластине смонтированы направляющие *s*, пластина *bl* с покрывным стеклом *d*, выполняющим функции крышки канала. В правом углу установлена компрессионная пипетка *pi*, состоящая из латунной трубки *ro* с отверстием *l*, резиновой трубки *gk* и стеклянного капилляра *Kp*. Латунная трубка соединена с резиновым шлангом *gu*, зажимами *pl* и пробкой *gs*. Конец капилляра входит в канал, ширина которого регулируется таким образом, чтобы соединить исследуемые клетки перед облучением.

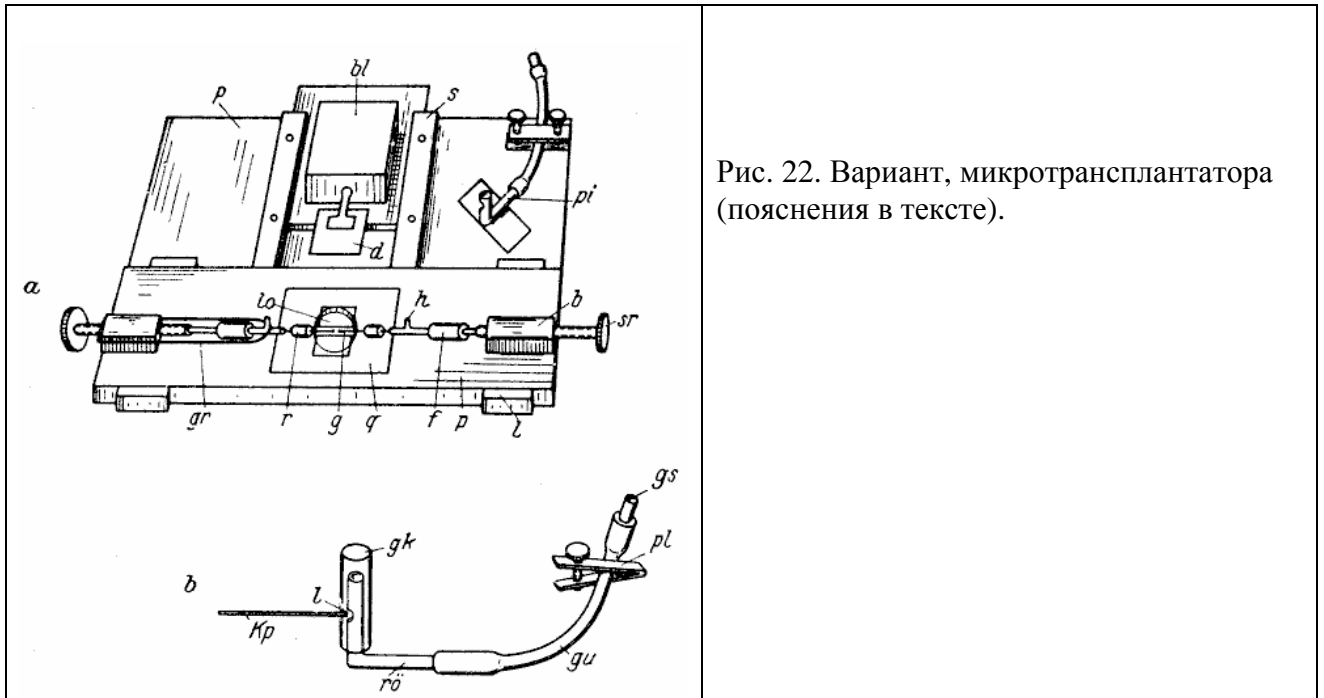


Рис. 22. Вариант, микротрансплантатора (пояснения в тексте).

Микровытягивание клеток

В ряде случаев клетки, обладавшие определенной пластичностью, можно деформировать, придавая им цилиндрическую форму, удобную для извлечения ядер или микрооблучения. Процедура связана с всасыванием яйца в капиллярную трубку с помощью шприца. Внутренний диаметр трубки несколько меньше диаметра яйца. Поворотом головки шприца добиваются всасывания яйца; противоположным поворотом обеспечивают выталкивание яйца из капилляра (рис. 23, а,б). Клетку после этой операции можно разрезать (рис. 23, в) с помощью бритвенного лезвия *r*, элемент которого вставляется в валик (рис. 23, д).

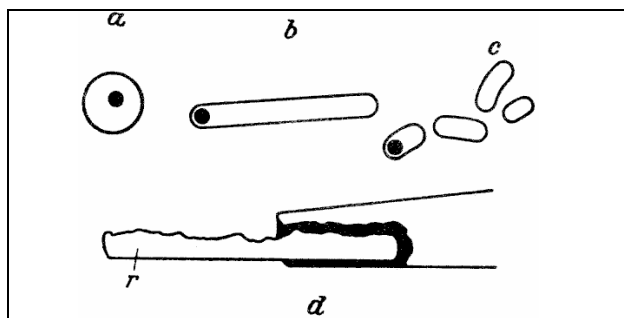


Рис. 23. Микровытяжной прибор (пояснения в тексте)

Капиллярные камеры

Эти приспособления позволяют вводить клетки в капилляры и выводить их оттуда. Конструкция капиллярной камеры изображена на рис. 24, а. На предметном стекле расположены две пластины *l* и *r*, между которыми с помощью капель жидкости *f* устанавливают капилляр *k*. Клетку вводят в левую каплю; поворотом пластины *r* добиваются понижения правого конца капилляра относительно левого. Клетка при этом втягивается в капилляр. Когда она доходит до середины капилляра, осуществляют отрыв капилляра от обеих капель путем подъема его с помощью рычага *h* с вилкой *g* (рис. 24, б). После этого капилляры размещают в одну из послеоперационных камер (типа той, которая изображена на рис.16) для исследования клеток и манипуляций с ними.

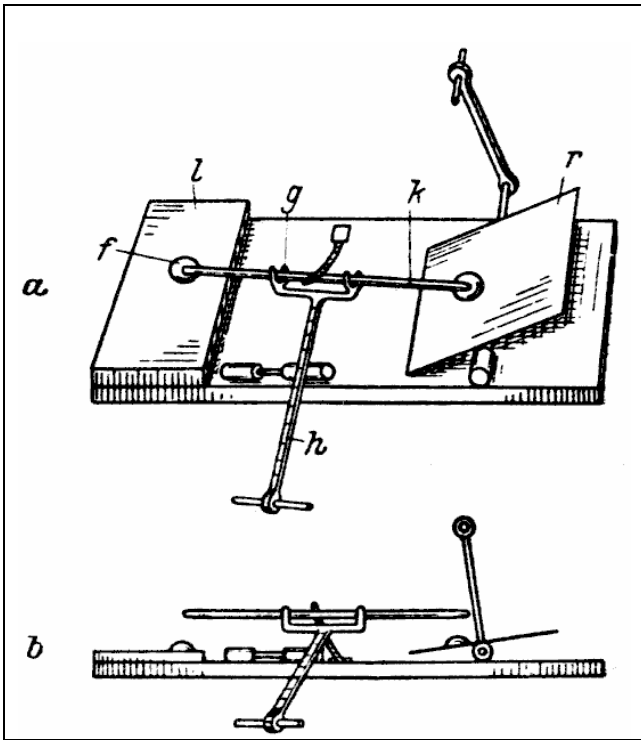


Рис. 24. Капиллярная камера: *a* - вид сверху; *b* - вид сбоку (пояснения в тексте)

Камера испарения

Данное устройство позволяет иммобилизовать подвижные клетки, исследовать воздействие на них различных газов. Конструкция, изображенная на рис. 25, состоит из металлической рамы *r* размерами 110x60x16 мм, закрытой сверху и снизу стеклянными пластинами, причем верхняя пластина - съемная. Камера снабжена двумя планками и объектодержателем *ot* с отверстием в центре, направляющими *sl* и кварцевым покровным стеклом *q*. Образованное отверстием пространство в объектодержателе может быть герметично закрыто с помощью парафинового масла. Сверху располагают обычное покровное стекло *dg*, которое также смазано парафиновым маслом и на которое переносят каплю с клеткой. У передней стороны камеры припаяна латунная трубка со штифтом *st*. Для подвода и отвода, газов используются трубки *gr*. На дне камеры имеется сосуд с концентрированной серной кислотой, необходимой для осуществления процесса испарения

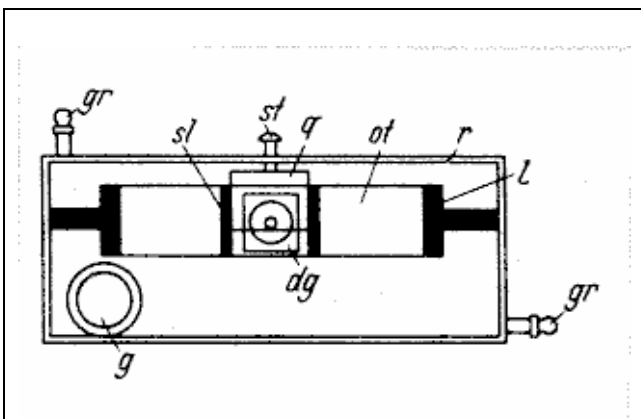


Рис. 25. Испарительная камера (пояснения в тексте)

жидкости капли. Испарение контролируется через микроскоп; при иммобилизации клетки с помощью штифта камера закрывается и испарение прекращается.

Приспособление для измерения дыхания

Зачастую представляет интерес исследование процесса обмена веществ в отдельной клетке и установление роли клеточных органелл в этих процессах. Например, можно проводить микрооблучение отдельных органелл (таких как ядра) с одновременным измерением дыхания клеток. Для этой цели С. Чахотин предлагает следующее приспособление (рис. 26), состоящее из тонкого кварцевого капилляра длиной 10 мм и внутренним диаметром 0,2 мм. В капилляре последовательно располагают: каплю парафинового масла $p1$ в качестве заглушки, каплю жидкости W с исследуемой клеткой Z , газовый пузырек g , каплю едкого калия K и еще одну каплю парафинового масла $p2$. Капилляр устанавливается на предметном стекле рядом с еще одним капилляром с раствором флуоресцеина, необходимого для фокусировки ультрафиолетового излучения. Процесс измерений сводится к определению объема газового пузырька с помощью окулярометра. В процессе дыхания кислород уходит из газовой смеси, а образующийся углекислый газ поглощается едким кали, объем газового пузырька при этом уменьшается.

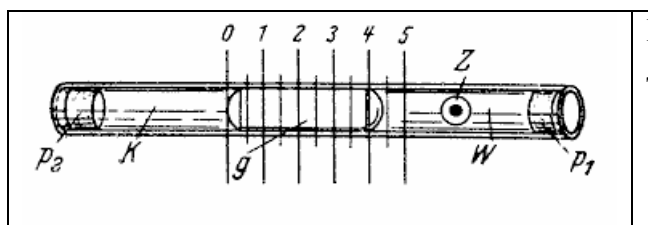


Рис. 26. Приспособление для измерения дыхания (пояснение в тексте)

Приспособление для заполнения капилляра

Процесс заполнения капилляров связан с такими технологическими операциями, как насечка, ломка капилляров и их заполнение. Для первых двух операций используются следующие конструкции. Одна из них, изображенная на рис. 27, состоит из латунной пластины с планкой l , к которой подводят капилляр K , фиксируемый пластинами $p1$ с помощью винтов Sr . В центре пластины имеется отверстие lo диаметром 5 мм, над которым расположен алмазный резец d в оправе b . Поворот резца осуществляют с помощью держателя h . Резцом надсекают капилляр в нужном месте. Ломают надсеченный капилляр с помощью другого приспособления (рис. 28), представляющего собой латунную пластину W с прямоугольным углублением f в центре, закрытым покровным стеклом. К упорной планке a подводят капилляр K , который фиксируется с помощью пластины S . Насечку располагают над отверстием; используя латунный блок b с трубкой, штифтом st и пружиной sf путем нажатия штифта производят ломку капилляра K .

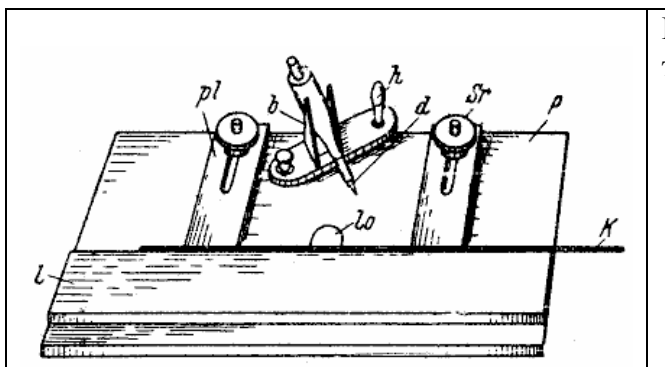


Рис. 27. Микронадсекатель (пояснения в тексте)

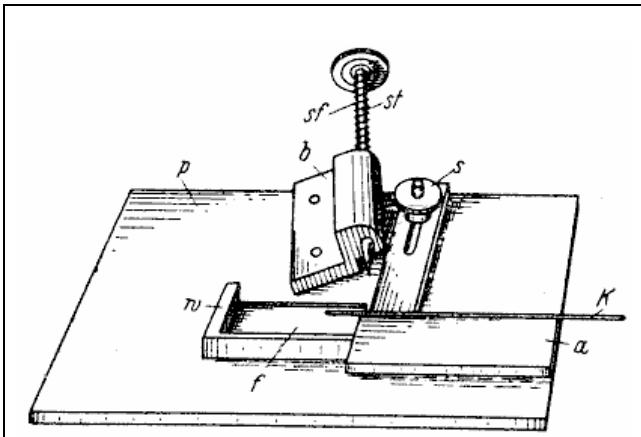


Рис. 28. Микроломатель надсеченного капилляра (пояснения в тексте)

Процесс заполнения капилляра производят с помощью устройства, изображенного на рис.29. На латунном основании p размером 40x90 мм с отверстием lo в центре располагают каретку с пластиной pl , перемещающейся вдоль основания. На пластине имеется еще одна каретка с узкой пластиной el , перемещающейся поперек основания. В центре этой пластины крепится с помощью прижимных винтов pr планка m , которая прижимает четыре стеклянных капилляра gk и пипетку d с клеткой. Один из капилляров (b) заполнен парафиновым маслом, второй (c) - жидкостью с исследуемой клеткой, третий (d) - 5%-ным раствором едкого кали, четвертый (e) - газом. Устройство состоит из всасывающей и компрессорной полоски st , латунной трубки r , шланга gu , стеклянной трубки g колпачка K . Для сжатия используется латунная коробка mk , одна из стенок lv которой может выдвигаться с помощью винта ds . Кварцевый капилляр qk последовательно, путем перемещения каретки с капиллярами $b-e$, заполняется содержимым этих капилляров, после чего проводят эксперименты с дыханием.

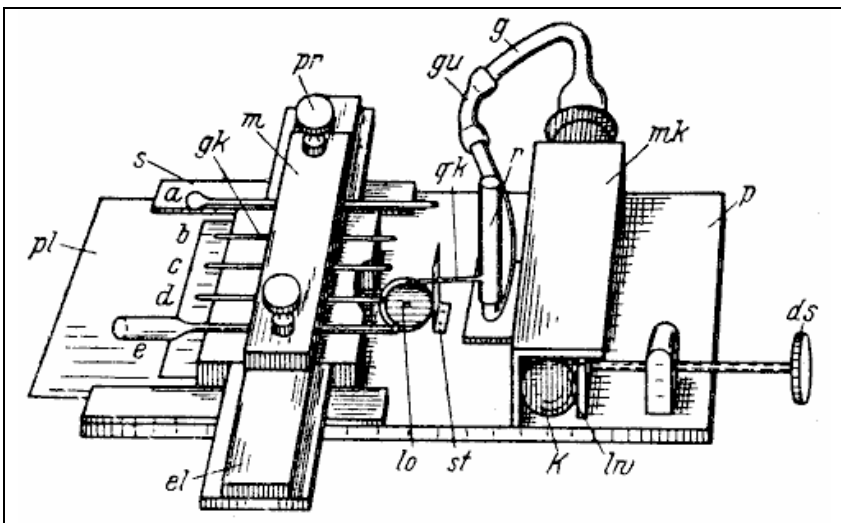


Рис.29. Приспособление для заполнения капилляра (пояснения в тексте)

Приспособление для термоэлектрических опытов

Вставляемый в держатель микроманипулятора инструмент состоит из цапфы Z к которой прикреплено плоское асбестовое кольцо A (рис. 30). К его нижней стороне прикреплена проволочная спираль S , свободные концы которой входят и зажимы на эбонитовой пластине E . К этим зажимам подводится напряжение 4 В. Контроль температуры производится с помощью капелек окрашенного в различной степени парафина, которые плавятся при различных температурах.

Для термоакустических опытов в держатель вставляется двойная микроигла M (рис. 31), обе части которой изолированы друг от друга и соединены с источником напряжения.

С.Чахотин предусмотрел и комбинацию микропипетки с электрическим

нагревателем. При прохождении электрического тока через спираль стеклянный баллончик пипетки нагревается и пипетка действует как компрессор; удаление спирали вызывает охлаждение воздуха в пипетке, которая при этом всасывает объект.

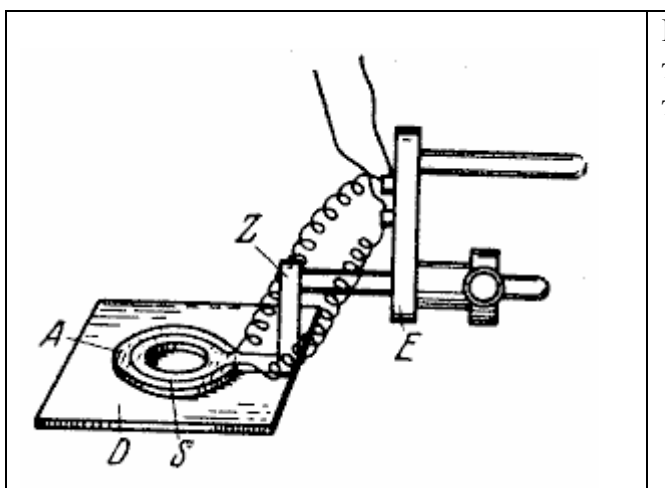


Рис. 30. Приспособление для термоэлектрических опытов (пояснения в тексте)

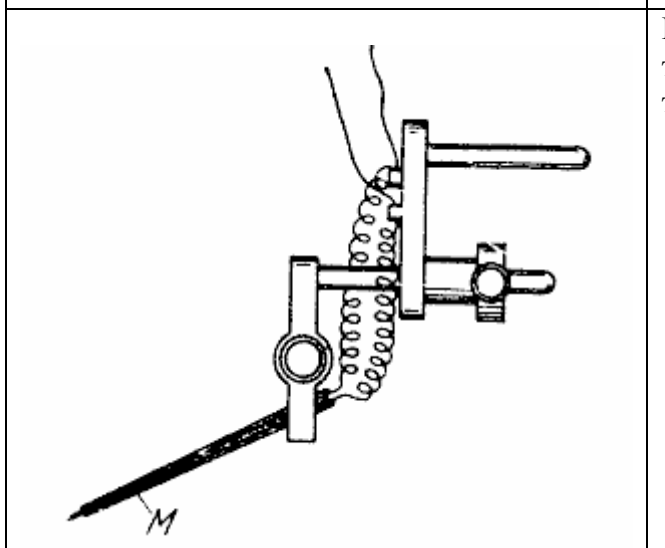


Рис. 31. Приспособление для термоакустических опытов (пояснения в тексте)

Метод микрокапель

Предложенная С.Чахотиным методика позволяет использовать микрокапли для хранения в них клеток, наблюдения за клетками в течение нескольких недель, извлечения клеток, воздействия на них различных физических и химических факторов и т.д. С этой целью используют предметное стекло с лункой, которая продувается для удаления пара и заливается чистым и прозрачным парафиновым или вазелиновым маслом (рис. 32). С помощью микропипетки диаметром 10 мкм и горелки Бунзена прокалывают слой масла и осаждают каплю воды. Эту операцию повторяют несколько раз, получая несколько рядов капель. В эти капли помещают исследуемые клетки. Для предотвращения испарения капли покрывают тонким слоем масла. Набор таких пластинок с лунками, содержащими ряды капель С.Чахотин назвал "микроклиникой".

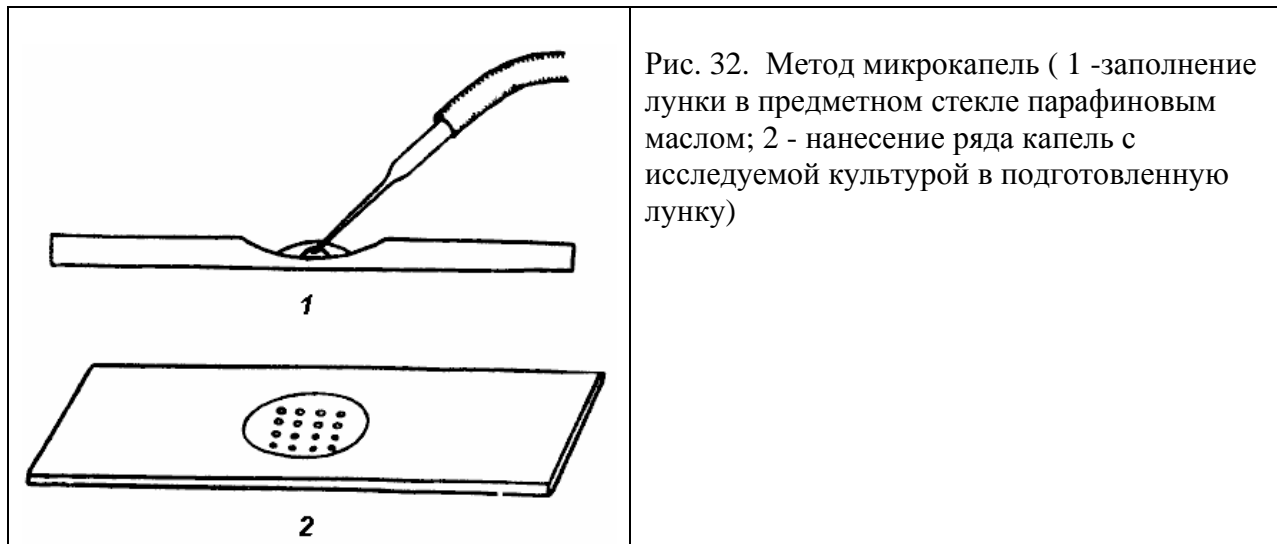


Рис. 32. Метод микрокапель (1 -заполнение лунки в предметном стекле парафиновым маслом; 2 - нанесение ряда капель с исследуемой культурой в подготовленную лунку)

II. УЛЬТРАФИОЛЕТОВОЕ МИКРООБЛУЧЕНИЕ КЛЕТОК

Экспериментальная техника

Одним из самых новаторских приемов, которые использовал С. Чахотин в своей деятельности, является воздействие сфокусированного ультрафиолетового излучения на отдельную клетку или её органеллы. Задача представляется далеко не простой даже в наше время; именно поэтому интересно проследить, каким образом решал ученый вставшие перед ним методические и экспериментальные проблемы.

Механическое вмешательство в клетку – иглой, микропипеткой – является возмущающим и поражающим воздействием, которое, к тому же, не может быть строго регламентировано в количественном отношении. Кроме того, механические действия над клеточными органеллами немислимы без механического повреждения наружной оболочки клетки. Все эти соображения заставили С.Чахотина прийти к необходимости замены механического манипулятора на сфокусированное ультрафиолетовое излучение. В 1912 году уже было известно бактерицидное действие коротковолнового ультрафиолетового излучения, которое использовали для стерилизации питьевой воды.

При разработке метода, который сам автор называл "ультрафиолетовым микроуколом", пришлось решать ряд конструктивных и методических задач. Необходимо было превратить микроскоп из инструмента наблюдения в операционный аппарат; обеспечить фокусировку коротковолнового ультрафиолетового излучения до размеров, соизмеримых с размерами клеточных компонентов (напомним читателю, что обычные стеклянные элементы оптики не пропускает ультрафиолетовое излучение; для работы с ним требуется кварцевые оптические детали). Немаловажной представлялась задача управления, манипулирования сфокусированным лучом и определения его местоположения.

Оригинально был решен вопрос с источником ультрафиолетового излучения (нельзя забывать, что ученый работал в начале столетия). В качестве источника ультрафиолетового излучения С.Чахотиным была использована искра, возникающая между магниевыми электродами. В спектре излучения этой искры наблюдалось много плотно расположенных линий в области 280 нм. Схематическое изображение оптической части опыта представлено на рис. 33.

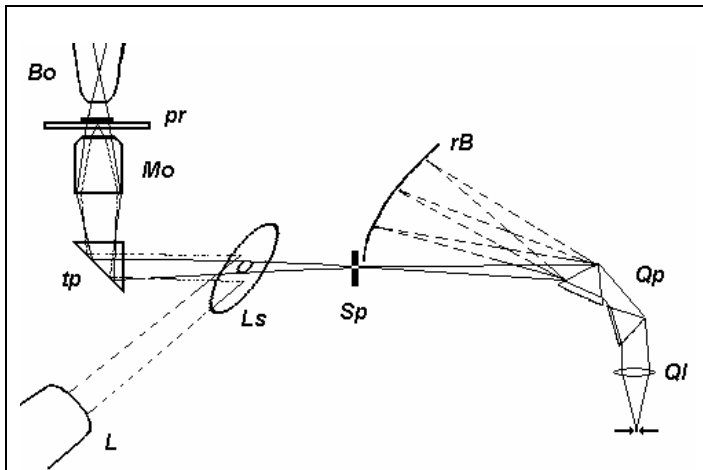


Рис. 33. Схематическое изображение оптико-спектральной части ультрафиолетового микрооблучателя С. Чахотина (пояснения в тексте)

Излучение фокусировали кварцевой линзой $Q1$ после чего направляли на две кварцевые призмы Qp , на которых излучение раскладывалось на отдельные спектральные линии rB , из которых в микроскоп направляли только те, которые находились в области 280 нм. Выделение этих линий осуществляли с помощью прецизионной щели Sp ; ею же регулировали величину ультрафиолетового луча. После щели излучение проходило через отверстие в зеркале Ls . Само зеркало необходимо для отражения света лампы L , и освещения поля наблюдения. С помощью отражательной кварцевой призмы tp излучение направляли через монохроматический объектив Mo , выполненный также из кварца, на объект pr , расположенный на предметном столике микроскопа Vo . Система позволяла фокусировать излучение размером от 5 до 2 мкм в плоскости препарата. Для определения месторасположения микролуча относительно клетки o использовали раствор флуоресцеина s в сочетании с подвижной механической стрелкой Z (рис. 34, а-d).

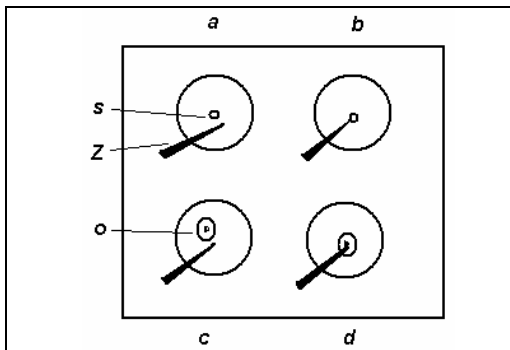


Рис.34.Определение месторасположения микролуча с помощью капли флуоресцеина (а - нанесение флуоресцеина; б - подведение механического указателя к капле; с - замена флуоресцеина исследуемой клеткой; d - подведение клетки к острие указателя).

Помимо аппаратных задач С.Чахотину пришлось столкнуться с проблемами фотохимического характера. Для того, чтобы предотвратить повреждение поверхности клетки при микрооблучении ядра, исследователь размещает клетки в смеси растворов, богатых ионами кальция, которые обладает вяжущими или отвердительными свойствами. Для исключения воздействий ультрафиолетового излучения на цитоплазму С.Чахотин использовал центрифугирование клеток, в результате которого ядро смещалось к периферии клетки и слой цитоплазмы между ядром и поверхностью клетки уменьшался) а затем сплющивал клетку (рис. 35, а - с).

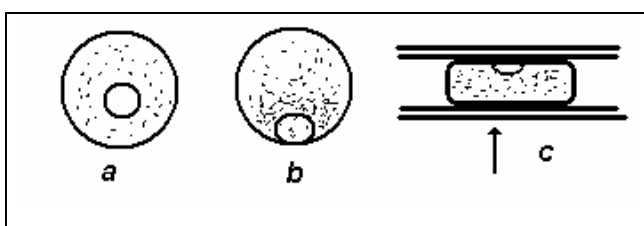


Рис. 35. Центрифугирование исследуемой клетки с целью смещения ядра к периферии (а - клетка до центрифугирования, б - клетка со смещенным ядром; с - сплюснутая клетка в процессе облучения ядра)

Техника микроманипулирования, операционные и послеоперационные камеры описаны в предыдущих разделах.

В целом, экспериментальная установка, предназначенная для микрооблучения клеток, представляет собой сочетание микроскопа, источника ультрафиолетового излучений и оптических элементов (рис. 36). Вариант установки с элементами, расположенными на оптической скамье, представлен на рис. 37.

Для получения искры как источника ультрафиолетового излучения был использован индуктор, состоящий из искрового промежутка, образуемого электродами bF , конденсаторов K и катушки индуктивности S , предохранителя Fs , трансформатора T , амперметра A , реостата W , включателя Sch (рис. 38).

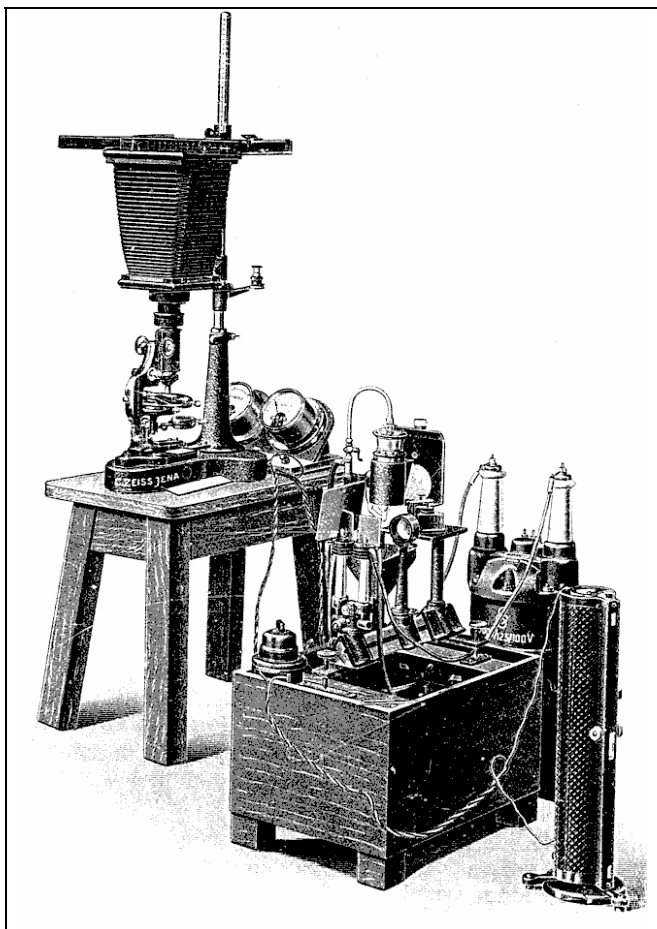


Рис. 36. Экспериментальная установка С. Чахотина, предназначенная для микрооблучения клеток

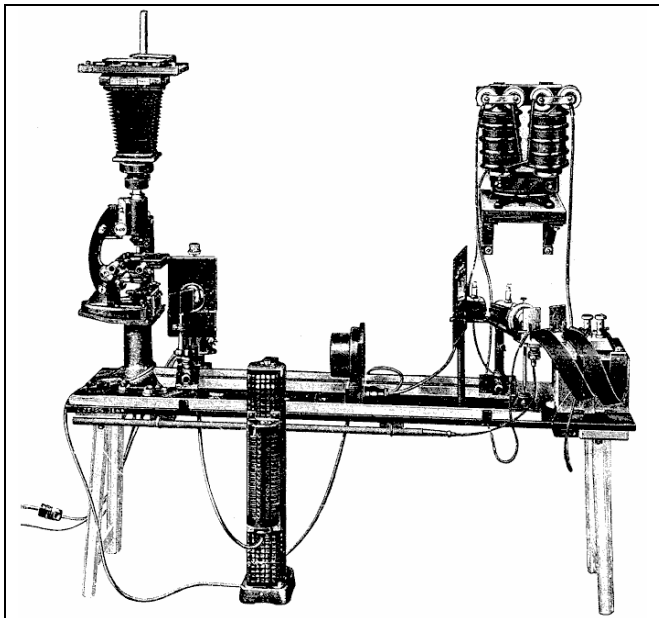


Рис. 37. Вариант установки для микрооблучения с расположением на оптической скамье (справа налево): индуктора с источником питания, диафрагм, оптических элементов, микроскопа, фотоаппарата)

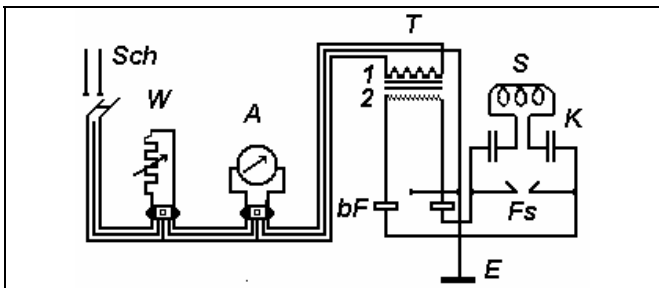


Рис. 38. Схема электропитания дуги, используемой как источник ультрафиолетового излучения (пояснения в тексте)

При необходимости использования ультрафиолетового излучения сравнительно невысокой интенсивности использовали вариант оптической схемы, изображенный на рис. 39, а. Здесь f - дуга, lk и Kk - кварцевые линзы, P - призмный столик, T - тубус, Kh - конденсор, Sp - щель; Sf - штатив микроскопа, tr - призма, Ls - зеркало. На рисунке проставлены и расстояния в миллиметрах между элементами схемы.

В случае использования высоких интенсивностей ультрафиолетового излучения применяется вариант схемы, изображенный на рис. 39,б. В данном варианте в кварцевой объектив попадает больше света. С этой целью используют сочетание призмы Qp , объектива

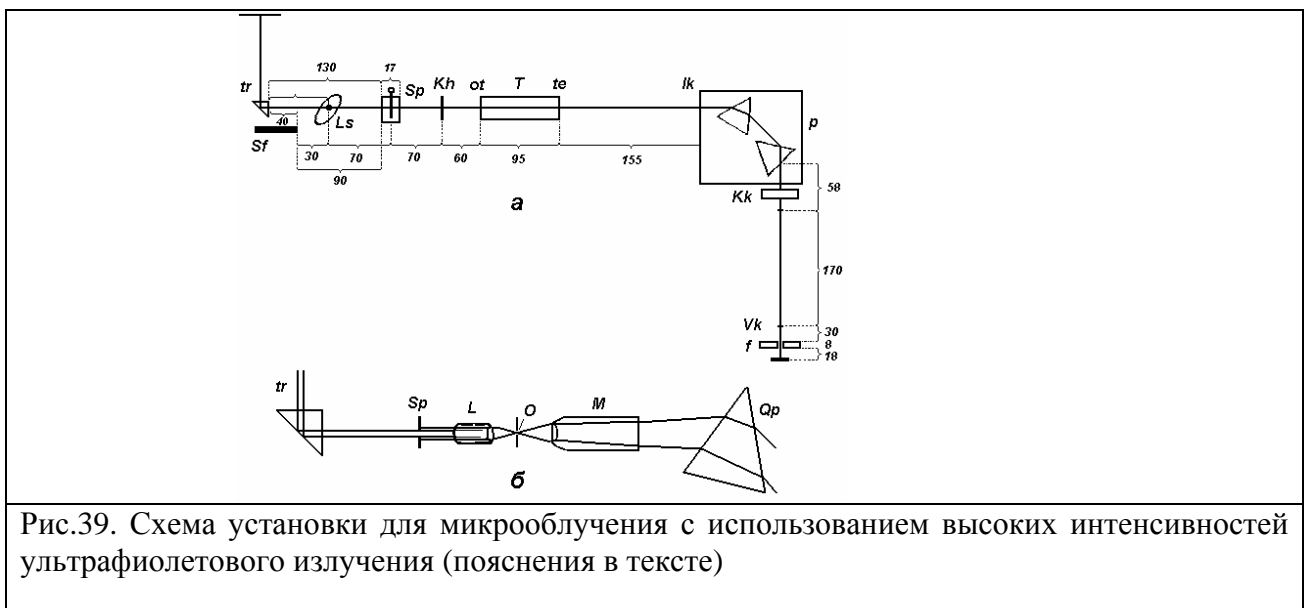


Рис.39. Схема установки для микрооблучения с использованием высоких интенсивностей ультрафиолетового излучения (пояснения в тексте)

M , диафрагм O и Sp , кварцевого окуляра l и призмы tr ; ультрафиолетовый луч, имевший диаметр 6 мм, после прохождения такой оптической системы сужается до 3 мм, за счет чего и увеличивается интенсивность.

Методика микрооблучения

Первым этапом в процессе микрооблучения является наведение сфокусированного излучения на объект. С этой целью на предметном столике микроскопа устанавливают препарат с каплей флуоресцеина и наводят на него резкость в светлом поле. Затем свет отключают. Устанавливают расстояние между электродами равным 1 мм и включают электрический ток. С помощью флуоресцирующего экрана (уранилового стекла) настраивают оптическую систему так, чтобы в щель попадала группа линий при 280 нм. Перемещая кварцевый объектив, добиваются четкого изображения светящейся зеленой точки в препарате. Затем, убрав ураниловое стекло, получают изображение щели. К этому изображению подводят указатель, совмещая его конец с изображением укола. Дугу перекрывают. Поле зрения опять делают светлым и размещают исследуемую клетку на предметном столике, совмещая ее с концом указателя, и подают ультрафиолетовое излучение на объект.

Для дозировки и количественных оценок интенсивности излучения С. Чахотин использовал кадмиевый фотоэлемент Z , сопряженный с источником питания E , тубусом ro и призмой gp (рис. 40); юстировку излучения, попадающего на фотоэлемент, он осуществлял с помощью уранилового стекла.

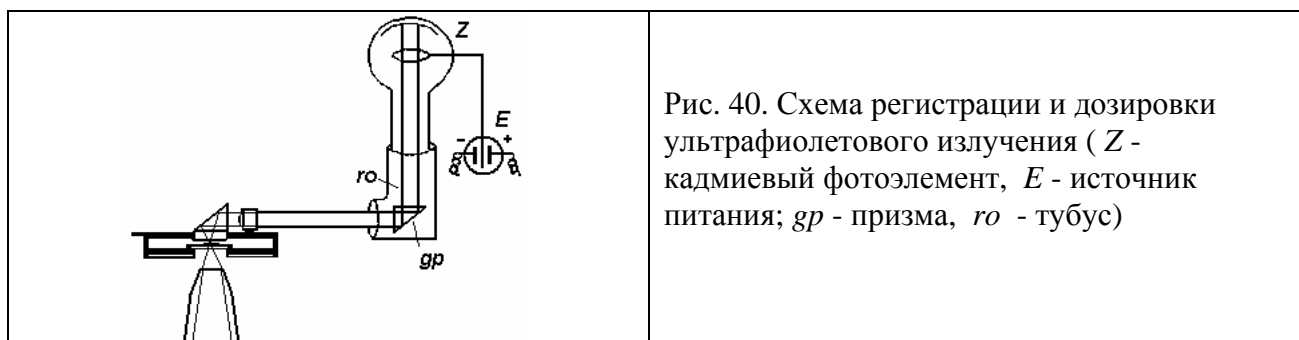


Рис. 40. Схема регистрации и дозировки ультрафиолетового излучения (Z - кадмиевый фотоэлемент, E - источник питания; gp - призма, ro - тубус)

Результаты микрооблучения клеток

В своих ранних работах, опубликованных в 1912 году, С. Чахотин сообщает о результатах применения сфокусированного ультрафиолетового излучения для терапии злокачественных опухолей. К тому времени уже проводились эксперименты по использованию рентгеновского излучения и радиоактивных изотопов радия для лучевой терапии в сочетании с введенными в организм химическими препаратами (в частности, холином). Было обнаружено, что ионизирующие излучения и растворы холина вызывали избирательное поражение отдельных тканей, особенно богатых лецитином. В пользу того свидетельствовали опыты, проведенные С. Чахотиным с расщеплением лецитина на компоненты при облучении его оптическим и ионизирующим излучениями. Для объяснения подобного поражающего действия излучений был выдвинут ряд гипотез, предполагающих разрушение ферментов, изменение проницаемости протоплазматической оболочки.

Сам С. Чахотин для выяснения возможных механизмов действия излучений на клетки сформулировал цель исследования следующим образом - если при облучении лецитин расщепляется, то образуемый при этом холин как липоидорастворимый компонент должен удерживаться дольше, чем другие продукты распада лецитина, липоидонерастворимые. Обнаружить холин себя может щелочной реакцией. Индикатором

этой реакции С.Чахотин избрал липоидорастворимый краситель (нейтральный красный), приобретающий при кислой реакции красно-фиолетовый цвет, при щелочной - соломенно-желтый. При воздействии ультрафиолетового излучения краситель не изменял своей окраски.

Объектами исследований были выбраны яйца морских ежей, клетки крови лягушек, птиц и раковые клетки мышей. Все эти виды клеток богаты лецитином. Было обнаружено, что предварительно окрашенные с помощью красителя в ярко-красный цвет клетки после облучения приобретает желтый цвет и распадаются. Добавляя липоидорастворимые кислоты для нейтрализации предположительно образовавшихся оснований, С.Чахотин наблюдал красную окраску. Этот факт подтверждал гипотезу о том, что сам краситель не выщелачивается из клеток при их распаде или изменении проницаемости протоплазматической оболочки. Добавление холина в клетки вызывало изменение окраски из красной в желтую.

С.Чахотин пришел к выводу, что при облучении клеток в них появляются ионы ОН, обусловившие изменение цвета красителя. При этом возникал вопрос о происхождении этих ионов - является ли они результатом распада какой-либо субстанции, или же проникают в клетку в результате изменения ее проницаемости из окружающей среды. Для решения этой проблемы С.Чахотин помещает клетки крови, ядра которых были окрашены и красный цвет, в изотонический раствор (0,6%-ный раствор NaCl), в котором не было ионов ОН. При этом он отмечает изменение цвета клеток. Разрушение оболочки яиц морских ежей, окрашенных в красный цвет, не привело к изменению окраски. Все эти факторы свидетельствуют о том, что при облучении клеток возможен процесс образования холина из составных частей лецитина клеток. Наличие в холине ионов ОН обуславливает разрушающее действие на клетку. Вполне очевидно и влияние разрушения клеточной оболочки под воздействием облучения и изменения проницаемости для ионов, поступающих в клетку из окружающей среды. Решающим фактором, по мнению С.Чахотина, в выяснении механизма избирательного действия облучения на клетки злокачественных новообразований, является распад лецитина и цитоллиз вследствие воздействия продуктов деления. Ученый приходит к выводу о перспективности исследования совместного действия облучений и химических препаратов (хемотерапии) при разрушении труднодоступных для хирургического вмешательства опухолей.

Серия экспериментов была посвящена исследованию возможности микрооблучения ядра яйца морского ежа. Предварительные опыты показали, что во избежание поражения слоя цитоплазмы необходимо производить облучение в течение короткого промежутка времени - ядерное вещество поглощает излучение более интенсивно, чем цитоплазма. Кроме того, были учтены имевшиеся к тому времени сведения (J.Loeb, R.Lillie и др.) о влиянии различных ионов на проницаемость плазматической мембраны - в то время как ионы К и Na увеличивают проницаемость, ионы Са оказывают противоположное действие. Воздействие сфокусированного (до 5 мкм и менее) ультрафиолетового излучения на яйцо морского ежа позволяет разрушить его в процессе деления, причем процесс деления тотчас же прекращается. Для исключения возможности разрушения плазматической мембраны необходимо производить микрооблучение в среде, содержащей избыток кальция.

Подвергая яйца морского ежа микрооблучению, С.Чахотин установил, что местная проницаемость плазматической мембраны увеличивается при воздействии излучения, что позволяет ионам окружающей среды проникать в клетку и вызывать в ней характерную реакцию. Об этом свидетельствуют и опыты с помещением клетки, окрашенной в красный цвет красителем, в раствор, содержащий ионы ОН. После микрооблучения происходит окрашивание яйца в желтый цвет. Во время активации и деления яйца увеличивается

проницаемость поверхностного плазматического слоя; у оплодотворенного делящегося яйца местная проницаемость имеет различные значения. Микрооблучение, по мнению С.Чахотина, по своему характеру напоминает естественные стимулы оплодотворения, вызывающие определенные этапы активации яйца, т.е. образование мембраны, деление яйца, сегментацию цитоплазмы. Процесс стимулирования клетки микрооблучением проходит настолько, медленно, что становится возможным анализировать автономные деления цитоплазмы.

Сферой научных интересов С.Чахотина были исследования функций стигмы у эвгленофитовой водоросли *Euglena gracilis*. Известно, что ряд водорослей проявляет специфические реакции на свет, изменяя при этом свои двигательные характеристики - скорость, направление движения, траекторию и т.д. У некоторых водорослей, в частности, *Euglena gracilis*, имеет место т.н. модуляционный механизм ориентации клеток на свет: если клетка движется к источнику света, то при вращении ее вокруг продольной оси происходит освещение парагугутикового тела, находящегося у основания жгутика и выполняющего функции фоторецептора, непрерывным светом. Сбоку, у края вакуоли, находится стигма - специфическая органелла, выполняющая роль модулятора света для фоторецептора (рис. 41). При отклонении движущейся клетки от направления распространения света происходят периодические затенения стигмой света, попадающего на фоторецептор; клетка производит корректирующие биения жгутиком, возвращаясь к той траектории, при которой модуляции света нет. Эффект усиливается за счет дихроичной природы фоторецептора.

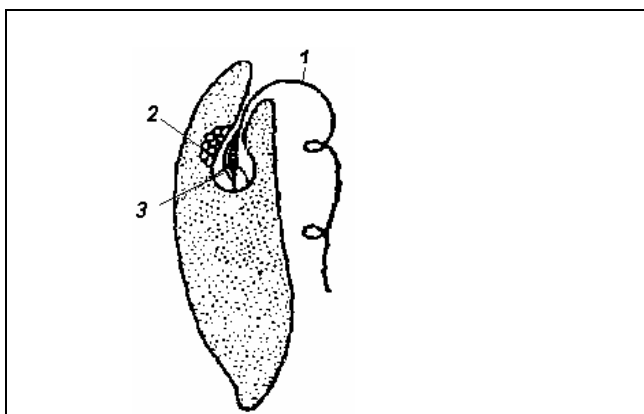


Рис. 41. Схематическое изображение одноклеточной водоросли *Euglena gracilis* (1 – жгутик, 2 - стигма. 3 - парагугутиковое тело)

Первые попытки выяснения функций фотоориентационного аппарата *Euglena gracilis* были проведены С.Чахотиным с помощью техники ультрафиолетового микрооблучения. Исследования показали, что при воздействии излучения с длиной волны 280 нм клетки отбрасывали жгутики, резко сокращались, принимая сферическую форму и раздуваясь. Была отмечена различная степень чувствительности переднего и заднего концов клетки к облучению - сокращение было более внезапным и более существенным при воздействии на переднюю часть клетки. Но самым интересным был опыт исследования фототаксиса *Euglena gracilis*, который ученый провел с присущей ему филигранностью. Два параллельно расположенных кварцевых капилляра, пропускающих ультрафиолетовое излучение, размещались на предметном столике микроскопа. В одном был раствор флуоресцеина, в другом - клетка *Euglena gracilis*. Вначале сфокусированное ультрафиолетовое излучение фокусировали на капилляре с флуоресцеином и фиксировали место фокусировки механическим указателем. Затем на место первого капилляра помещали второй, с клеткой; ограниченный участок этого капилляра освещался белым светом конденсора микроскопа. Клетка двигалась до границы "свет-тень", возвращалась ко второй границе и, таким образом, совершала реверсивные движения, определяемые пространственными градиентами света. С помощью микрооблучения стигмы *Euglena gracilis*, С.Чахотин нарушал работу фотоориентационного механизма клетки, что и проявлялось в виде пересечения ею границы освещенного участка. Мало того,

возбуждение стигмы монохроматическим светом различной длины волны показало, что красная, желтая и зеленая области спектра не вызывают фотодвижения клетки, чего нельзя сказать о синей и фиолетовой области. На основе проведенных исследований С. Чахотин установил, что стигма действительно является примитивным органом зрения клетки, который управляет ее фотодвижением; ультрафиолетовое (280 нм) облучение стигмы "ослепляет" клетку; в видимой области спектра стигма реагирует на сине-фиолетовый свет; локальное микрооблучение клетки вызывает ее сокращения, причем передняя часть клетки представляется более чувствительной к облучению.

Следует отметить, что представления С. Чахотина о функциональных и спектральных свойствах стигмы *Euglena gracilis* мало изменились и в наше время.

Совместно с французским естествоиспытателем из Сорбонны П. Гаваданом (P. Gavaudan) ученый проводит исследование влияния микрооблучения на гриб *Ascoidea rubescens*. Предварительные эксперименты показали, что при обработке гриба витальными красителями происходят определенные структурные модификации - вакуолярная система сокращается до нескольких сферических вакуолей, расположенных вдоль клетки. Это состояние, продолжающееся несколько минут, обратимо. Облучение клеток по методу С. Чахотина привело к упомянутой выше вакуолярной реакции после 10–15 с воздействия ультрафиолетового излучения; при облучении части клетки реакция происходит через

15–30 с. Реакция имеет место лишь при помещении клеток в питьевую воду с рН 7,2. Время облучения, необходимое для реализации, зависит от значений рН среды: от 11 с при рН 7,2 до 105 с при рН 4,2. Показано, что возмущающее действие ультрафиолетового облучения *Ascoidea rubescens* является эффективным в присутствии ионов ОН. Совместное действие кислот и оснований с одной стороны, и ультрафиолетового излучения - с другой, показало, что вакуолярная реакция происходит при использовании щелочи и не имеет место при добавлении кислоты. Авторы приходят к выводу, что следует отличать реакцию проницаемости поверхностного слоя цитоплазмы от вакуолярной реакции, которая связана с внутренним изменением цитоплазмы. Микрооблучение увеличивает проницаемость клетки для компонентов окружающей среды, что приводит к вакуолярной реакции.

Очень важным представляется исследование О. Чахотина, проведенное с парамециями. Воздействие на клетки ультрафиолетового излучения с длиной волны 310 нм не приводило к каким-либо нарушениям или изменениям процессов жизнедеятельности клеток. Однако, добавление раствора эозина в сочетании с микрооблучением приводило к сократительным реакциям клеток. Краситель в данной ситуации выступает в качестве фотосенсибилизатора, повышающего чувствительность организма к излучению.

Еще один опыт с парамециями был посвящен проблеме изучения условных реакций рефлекторного типа. Если на пути следования клетки поместить тонкий ультрафиолетовый луч, то при соприкосновении с ним клетка отскакивает и обходит луч. После многократных столкновений клетка продолжает огибать луч, даже если убрать последний: у нее сформировалась условная реакция, подобная таковой у высших организмов.

Продолжая серию экспериментов с парамециями, С. Чахотин облучает одну из сократительных вакуолей, а затем и вторую. Клетки перестают пульсировать и выделять воду. Но если подвергнуть микрооблучению цитостом, вода выделяется за счет диффузии через поверхность клетки и парамеция вновь "оживает". С. Чахотин сравнивает данное явление с отеком при уремическом кризисе у высших животных и человека.

Итак, основные результаты, к которым пришел С. Чахотин при использовании техники ультрафиолетового микрооблучения ("микроукола", "лучевой микропункции", "микрофотохирургии"), можно сформулировать следующим образом:

1. В действии облучения на живую субстанцию необходимо различать как модификацию проницаемости поверхностного слоя клетки, как и коагуляцию белков и других компонентов цитоплазмы. При этом изменение проницаемости клеточной оболочки вызывает поступление в клетку ионов из окружающей среды.

2. Установлен механизм избирательного действия облучения на клетки злокачественных опухолей, определяемый распадом лецитина и цитолизом вследствие воздействия продуктов деления. Опыты по совместному действию облучения и химических препаратов (фотосенсибилизаторов) свидетельствуют о перспективности фотосенсибилизации для диагностики и терапии злокачественных образований.

3. Воздействие сфокусированного ультрафиолетового излучения (275-280 нм) на яйца морского ежа стимулирует партеногенез яиц, что позволяет изучать процессы оплодотворения.

4. Изучены функции стигмы при воздействии на нее ультрафиолетового (280 нм) и монохроматического излучения в видимой части спектра. Отмечены: участие стигмы в фотодвижении *Euglena gracilis*, чувствительность стигмы в сине-фиолетовой области спектра, влияние локальных микрооблучений на сократительные реакции клетки.

5. Исследованы вакуолярные реакции клеток гриба *Ascoidea rubescens* (из гемааскомицетов) в зависимости от продолжительности облучения, рН среды, присутствия ионов ОН.

6. Обнаружены эффекты микрооблучения парameций: локальное выпадение ресничек, деформация поверхности, изменение выделений воды, реакции рефлекторного типа, фотосенсибилизирующее действие облучения (310 нм) и эозина на сократительные реакции клеток.

7. Изучена роль ядра в дыхании клетки; проведены фотометрические измерения в области ядра и цитоплазмы.

Наряду с разработанной С. Чахотиным техникой микроманипулирования и серией проведенных им физиологических и эмбриологических исследований эти результаты представляют неоспоримую ценность и в наше время.

Дальнейший прогресс в своей научной деятельности С. Чахотин видит в реализации следующего плана (1935 г.):

1. Продолжение изучения роли клеточного ядра в развитии клеточных процессов; воздействие микрооблучения клетки на ход ее развития, движения, секреции и т.д.

2. Искусственное инициирование развития яйца посредством периферического микрооблучения - метода, по своей сущности являющегося промежуточным между химическим вмешательством и нормальным оплодотворением.

3. Решение проблемы детерминирования в развитии путем микрооблучения отдельных бластомер оплодотворенного яйца и анализа последующих результатов.

4. Разрушение, повреждение или раздражение клеточных органелл с целью

выяснения их функций и участия в жизнедеятельности клетки.

5. Искусственное слияние яйцеклеток, фрагментов яйца и бластомеров; проведение опытов по трансплантации и вегетативной гибридизации.

6. Удаление ядер из клеток после микрооблучения; перенос их в другие клетки.

7. Разделение клеток на части с помощью сфокусированного излучения.

8. Дальнейшее исследование проницаемости поверхности клетки, ее изменений во время сегментации и локальных микрооблучений.

9. Изучение влияния различных ионов и токсических веществ на проницаемость клетки.

10. Определение рН среды внутри клетки по изменению ее окраски после облучения.

11. Селективное воздействие сфокусированного ультрафиолетового излучения на отдельные клетки зародыша, находящегося в слабом токсическом растворе, с последующим контролем хода развития организма.

12. Комбинация микрооблучения и ультрамикроскопии с целью изучения локальных изменений коллоидов в клетке после облучения.

13. Проведение исследований с монохроматическим сфокусированным излучением и выявление зависимости эффектов облучения от длины волны.

14. Фотометрия клетки, связанная с определением как поглощенной, так и прошедшей через различные участки клетки энергией.

15. Рассмотрение возможности использования ионизирующих излучений для локальных воздействий на клетку.

РЕАЛИЗАЦИЯ ИДЕЙ С.ЧАХОТИНА В НАШЕ ВРЕМЯ

Экспериментальные методы по ультрафиолетовому микрооблучению клетки, разработанные С.Чахотиным, получили самое широкое приложение к различным областям биологии и биофизики. Рассмотрим некоторые из них.

Так, в экспериментальной протозоологии, метод был использован для изучения ряда проблем клеточного морфогенеза инфузорий, в частности, *Paramecium aurelia*, *Urostyla weissei*, *Stentor coeruleus* и др. Ленинградские ученые С.И.Фокин и Д.В.Осипов поставили своей целью использовать ультрафиолетовое облучение инфузорий для исследования ядерного дуализма. Дело в том, что у таких микроорганизмов как инфузории вегетативная клетка содержит ядра двух различных типов: соматическое, высокополиплоидное - макронуклеус (МА) и генеративное - микронуклеус (МИ). Селективное облучение этих органелл позволило бы получить информацию о функциональных особенностях отдельных элементов ядерного аппарата.

Обездвиженные клетки *Paramecium caudatum* были подвергнуты воздействию сфокусированного до 70 мкм^2 (луч имел квадратную форму), а в ряде случаев - до 23 мкм^2 ультрафиолетового излучения с длиной волны около 260 нм. Исследования проводили с двумя клонами – М-3I с нормальной организацией ядерного аппарата и М-3I-20-омега,

содержащим внутриядерные симбионты (в данном случае - грам-отрицательные бактерии). В процессе опытов были подвергнуты облучению чистый МИ в клетках клона М-3I (рис.42, 1), зараженный МИ клеток субклона М-31-20-омега (рис. 42, 2а), зараженный МИ с последующей реактивацией видимым светом (рис. 42, 2б), участок МА клеток М-31-20-омега (рис. 42, 3), участок цитоплазмы клеток М-3I-20-омега (рис.42, 4), и, наконец, делящиеся клетки субклона М-31-20-омега (рис.42, 5). Авторы установили, что элементы ядерного аппарата инфузорий характеризуются неодинаковой чувствительностью к

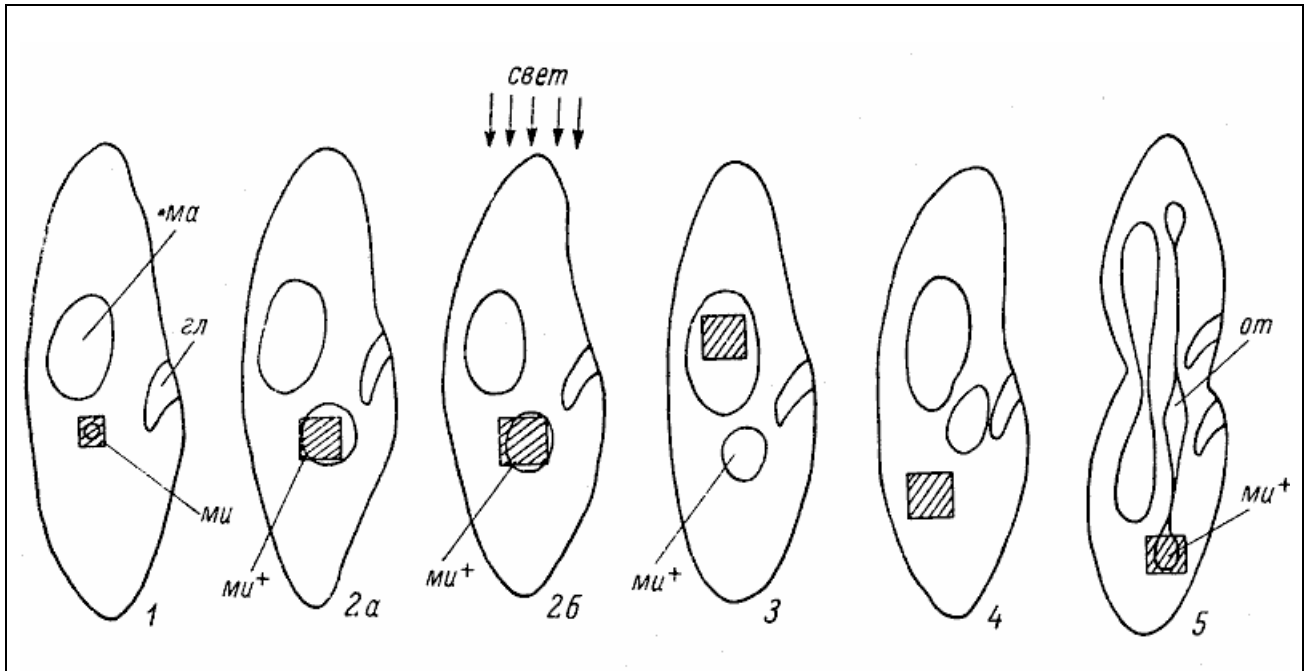


Рис. 42. Серии опытов, проведенных С.И.Фокиным и Д.В.Осиповны, по ультрафиолетовому облучению парамеций (1 - клон М-3I; 2а -5-субклон М-31-20-омега; ми -микронуклеус; ми⁺ -мпкронуклеус, инфицированный омега-частицами; ма - макронуклеус; гл - глотка; от - остаточное тело веретена деления зараженного микронуклеуса; заштрихованные квадраты - зона микрооблучения (дана не в масштабе)

ультрафиолетовому облучению. Были произведены количественные оценки чувствительности цитоплазмы, макро- и микронуклеуса и симбиотических бактерий МИ. В результате микрооблучения могут иметь место снижение эффективности клонирования, утрата, микронуклеусом бактерий, появление клеток с несколькими МИ и амикронуклеарных клеток. Отмечена возможность восстановления повреждений, вызванных ультрафиолетовым облучением, при освещении клетки видимым светом.

Разнообразные возможности применения ультрафиолетового микрооблучения к исследованию свойств, структуры и функций отдельных, клеточных органелл. Объем данной работы не позволяет детально осветить все аспекты этого направления. Вот только краткий перечень результатов работ по микрооблучению клеток: исследование процесса "побледнения" хромосом при их локальном облучении; инициирование распада и роста зрелых интерфазных ядрышек; избирательное повреждение митохондрий, пластид и плазматической мембраны, изучение механизмов митоза путем селективного воздействия ультрафиолетового излучения на отдельные элементы митотического аппарата; выяснение разнообразных аспектов индуцированной микрооблучением пролиферации клеток; нарушение синтеза РНК, ДНК и белка и т.д. (советуем читателю за более подробными сведениями обратиться к работам В.Н.Сахарова).

Со времени разработки и создания С.Чахотиным первого прибора,

предназначенного для ультрафиолетового микрооблучения клеток, экспериментальная техника совершенствовалась и развивалась, претерпевая существенные изменения. К последнему можно отнести использование отражательных объективов, позволяющих с их помощью объединить процесс облучения и наблюдения клеток, а также избежать применения флуоресцирующих экранов; применение монохроматоров для спектральных исследований на клеточном уровне; усиление контраста биологических объектов; ограничение линзовых аберраций; использование отражательных конденсоров; сопряжение микроскопической техники с телевизионной регистрацией (подробно эти методические приемы изложены в обзоре А.П.Дуброва).

Но подлинный расцвет техника микрооблучения получила после появления уникального прибора - лазера. С созданием этого устройства были сразу же проведены попытки использовать лазерное излучение для воздействия на клетку и ее органеллы. Пионерской здесь можно считать работу Бессиса (Bessis M.) с соавторами, связанную с лазерным микрооблучением клеток крови. Можно отметить также целенаправленные исследования структурно-функциональных особенностей клеток, проводимые Бернсом (Berns M.W.).

В своих работах Бернс с соавторами производил селективную инактивацию ядрышкового организатора и удаление целой хромосомы с последующим клонированием облученной клетки. Такое избирательное повреждение хромосом позволило изучить функции этих генетически важных структур. Разработана методика получения клонов клеток с удаленными участками хромосом или всей хромосомы. Кроме того, были проведены исследования по установлению точного месторасположения ядрышкового организатора путем микрооблучения перетяжки и участков, удаленных от нее.

В настоящее время спектр возможных применений лазерного микрооблучения клетки довольно широк и вряд ли возможно осветить результаты всех исследований. Остановимся лишь на некоторых, наиболее характерных.

Лазерное микрооблучение нервных клеток рака позволило А.В.Узденскому исследовать ультраструктурные и цитохимические изменения митохондрий облученного нейрона. Автор наблюдал группировку митохондрий в околоядерной зоне, неравномерные изменения профиля ядерной мембраны и локализацию ядерного хроматина. Все это свидетельствует о различной метаболической активности отдельных областей сомы нейрона при лазерном микрооблучении.

Киевские ученые (Н.Ф.Гамалея, Е.Д.Шишко) использовали излучение ксенонового (495; 533 и 595 нм и азотного (337 нм) лазеров для воздействия на опухолевые и нормальные клетки в культуре ткани. Диаметр луча составлял 0,6-0,8 мкм. Целью исследований было выяснение возможности селективной фотосенсибилизации облучаемого участка клетки при совместном действии лазерного излучения и ряда красителей (в частности, акридинового оранжевого, эритрозина, родамина 6G). Кроме того, облучение клеточных органелл излучением азотного лазера (ближняя ультрафиолетовая область) позволило оценить чувствительность клеточных органелл. Введение химических соединений (красителей, витаминов, коферментов, антибиотиков) позволяет управлять чувствительностью органелл к облучению. Практическая целесообразность этих исследований связана с возможностью реализации диагностики злокачественных опухолей на ранних стадиях и терапии. Селективное поглощение фотосенсибилизатора опухолевыми клетками позволяет при облучении возбуждать их флуоресценцию, а при соответствующем подборе интенсивности света и дозы облучения - и разрушать эти клетки.

Лазерное микрооблучение клеток культуры ткани миокарда крысы (для этих целей

был использован аргоновый лазер с длинами волн 514,5 и 488 нм) позволило зарегистрировать ритмическую пульсацию облученных клеток и установить специфические повреждения клеточных митохондрий. По предположению Н.Ф.Гамалеи, основную роль в процессе резких движений клетки после микрооблучения митохондрий играют восстановленные цитохромы $C + C_1$, максимум спектра поглощения (510 нм) которых совпадает с линиями излучения аргонового лазера.

В своих работах С.Чахотин направлял сфокусированное ультрафиолетовое излучение на стигму – специфическую органеллу одноклеточной водоросли *Euglena gracilis* с целью выяснения ее функциональных особенностей в процессе фотоориентации клетки относительно направления распространения света. Эта способность *E. gracilis* демонстрировать характерные реакции на свет была известна еще в начале столетия. Вполне естественным был интерес ряда исследователей, в том числе и С.Чахотина, к проблеме исследования механизма фотоориентации и степени участия клеточных органелл в процессе фотодвижения *E. gracilis*.

Эта водоросль проявляет двигательные реакции на изменения внешнего освещения (например, внезапное уменьшение или увеличение интенсивности света); при этом жгутик, производящий обычно колебания относительно продольной оси клетки, изменяет свое положение, колеблясь а перпендикулярном направлении. Причем, в процессе этих переориентаций жгутика клетка производит повороты. По мнению некоторых авторов (Diehn В., 1970, 1979) клетки *E. gracilis* способны сосредотачиваться в области умеренной освещенности или покидать ярко освещенные участки.

В этих реакциях *E. gracilis* на внешние световые условия особую роль играют две органеллы – стигма и паражгутиковое тело – специфическая органелла, выполняющая функции фоторецептора. Мы писали выше о модуляционном механизме фотоориентации клетки при ее вращении. Тот факт, что фотореакции *E. gracilis* проявляются в определенной спектральной области (от 350 до 500 нм), позволяет предположить участие в фотодвижении определенных пигментов. Вполне естественной представляется попытка идентифицировать эти пигменты выделив такие фоторецепторные органеллы и проведя соответствующий спектральный анализ. Однако, паражгутиковое тело *E. gracilis* имеет довольно малые (1х0,3х0,4 мкм) размеры, так что процедура его выделение является не простой задачей. Вот здесь-то и приходит на помощь техника микрооблучения, разработанная С.Чахотиным и модифицированная с учетом современных достижений техники.

Так, для идентификации пигментов, находящихся в паражгутиковом теле *E. gracilis*, был использован лазерный спектрофлуориметр, состоящий из перестраиваемого по частоте лазера на красителях, люминесцентного микроскопа и системы регистрации (рис. 43), Излучение лазера, область перестройки которого составляет 380-480 нм, фокусируется с помощью объектива микроскопа и направляется на паражгутиковое тело *E. gracilis*, возбуждая при этом флуоресценцию пигментов. Излучение флуоресценции проходит через микроскоп в обратном направлении, жидкостный фильтр и попадает на фотоприемник, электрический сигнал с которого регистрируется многоканальным анализатором.

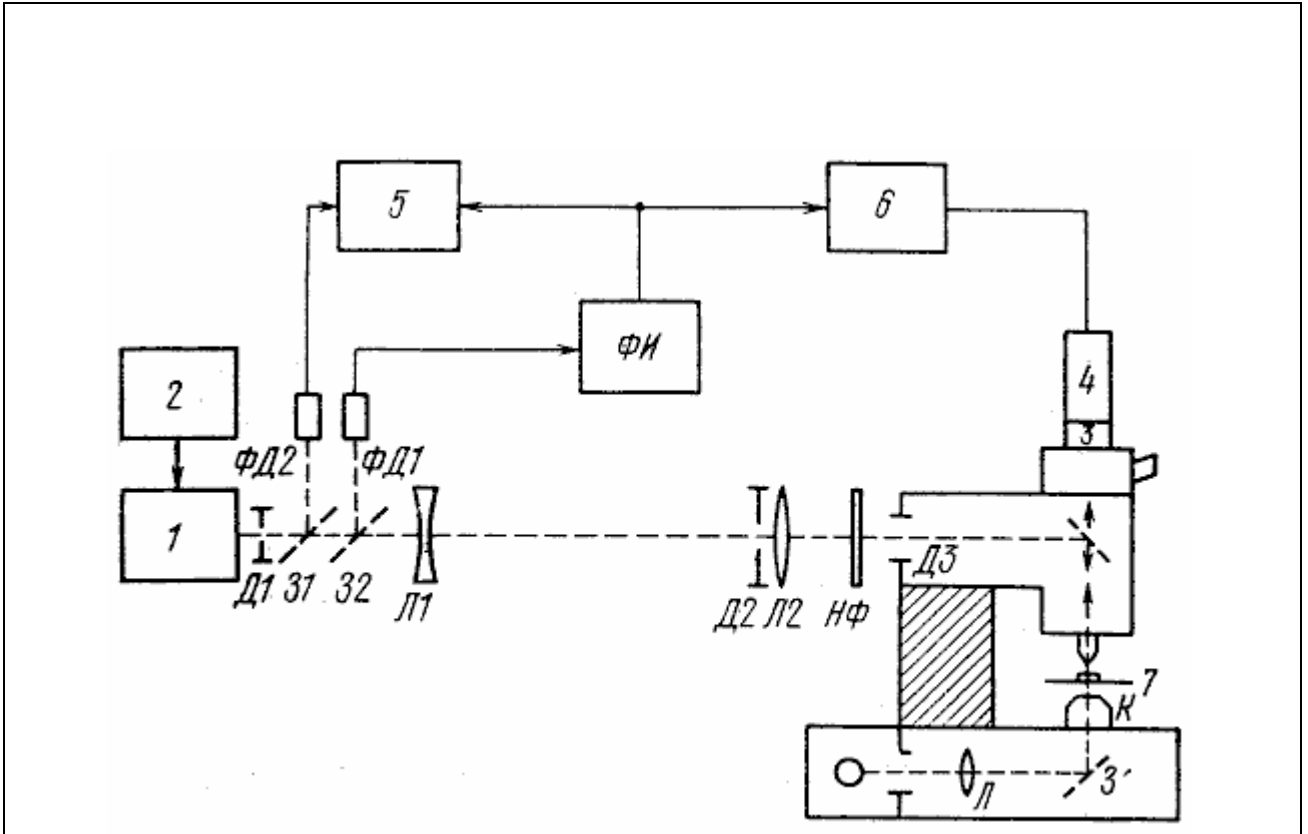


Рис. 43. Схема лазерного спектрофлуориметра (1- лазер на красителях; 2 - азотный лазер накачки; 3 - жидкостный фильтр; 4 - фотоприемник; 5-6 - многоканальные анализаторы; 7 - объект; Д1-Д3 - диафрагмы; Л1-Л2 - линзы; 31-32 -зеркала; НФ - нейтральный фильтр; ФД1-ФД2 - фотодиоды; ФИ - формирователь импульсов; К - конденсор)

Экспериментальная установка позволяет сравнивать амплитуды импульсов флуоресценции и импульсов возбуждения, для этого используются второй многоканальный анализатор и формирователь импульсов. Каждый анализатор сортирует прибывающие импульсы по амплитуде, распределяя их по различным каналам.

Подобная система позволяет сфокусировать лазерное излучение в пятно диаметром до одного микрометра. Для каждой длины волны возбуждения была определена интенсивность флуоресценции собственно паражгутикового тела, цитоплазмы и предметного стекла. Нормированное излучение флуоресценции, определяемое вкладом этих трех факторов, в зависимости от длины волны представляет собой спектр возбуждения пигментов *in vivo*, присутствующих в фоторецепторе *E.gracilis* (рис.44). Сравнение этого спектра с таковым для водного раствора рибофлавина (рис.45) свидетельствует о том, что именно флавины могут претендовать на роль фоторецепторных пигментов *E.gracilis*.

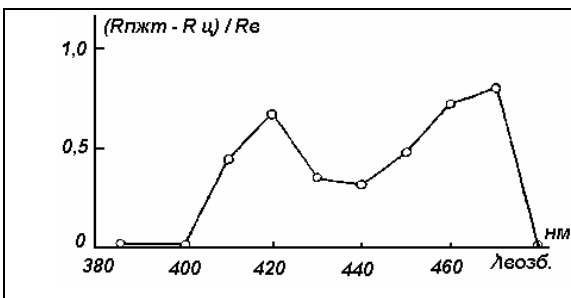


Рис. 44. Спектр возбуждения флуоресценции пигментов паражгутикового тела *Euglena gracilis*, полученный методом лазерной микроспектрофлуориметрии. Здесь $R_{пжт}$, $R_{ц}$ и R_e - отклики, полученные при облучении паражгутикового тела, цитоплазмы и предметного стекла соответственно

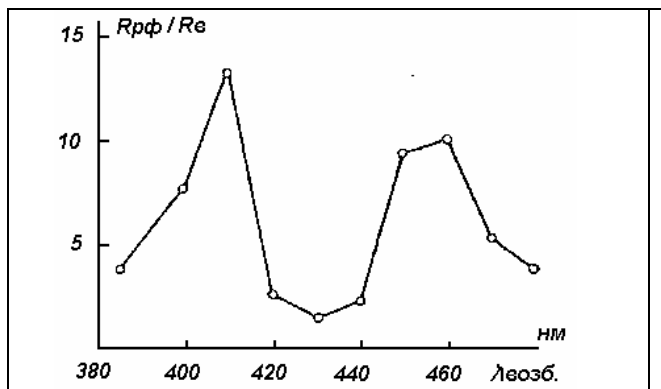


Рис. 45. Спектр возбуждения флуоресценции водного раствора рибофлавина. Здесь $R_{рф}$ и R_c - отклики, полученные при облучении рибофлавина и предметного стекла соответственно

Это исследование было выполнено Ф.Гетти, Э.Кампани, Д.Коломбетти, Ф.Ленчи, Э.Полакко (Италия) и автором этой книги.

Важным параметром в подобных исследованиях является время затухания флуоресценции, поскольку поведение и величина этого параметра существенно зависит от тех путей, по которым передается энергия возбужденной молекулы ее окружению. Процедура определения времени затухания флуоресценции сводится к фокусировке возбуждающего излучения на клеточную органеллу, приему излучения флуоресценции при возбуждении образца сигналом известной временной формы, преобразований излучения флуоресценции в электрический сигнал и построению зависимостей, позволяющих определить время затухания флуоресценции. Измерение этого параметра позволяет оценить степень взаимодействия флуорохрома с соседними молекулами, межмолекулярные расстояния, структуру молекул и т.д.

Группа итальянских физиков (Sacchi C., Andreoni A., Svelto O.) провела с помощью техники лазерной микрофлуориметрии исследование вторичной флуоресценции комплексов, образованных молекулой ДНК с рядом акридиновых красителей. При подходящих условиях эти комплексы создаются путем интеркалирования красителя между двумя соседними парами оснований ДНК. Причем отмечено, что интенсивность флуоресценции этих комплексов существенным образом зависит от связываемого участка - она увеличивается при связи красителя между основаниями аденин-тимин и уменьшается в случае комбинации гуанин-цитозин. Обнаружено еще одно интересное свойство комплексов "ДНК-краситель":

при освещении хромосом ультрафиолетовым излучением определенные, довольно узкие (~ 1 мкм) полосы флуоресцируют более интенсивно, чем другие. Очевидно, что явление может быть использовано для идентификации хромосом.

Анализ кривых затухания флуоресценции подобных комплексов позволяет произвести разнообразные количественные оценки.

Читатель помнит, какое внимание уделял С.Чохотин проницаемости клеточной оболочки. Проблема остается актуальной и в наши дни, часто бывает связана с изучением процессов диффузии и конвекции компонентов клеточных мембран. Для исследования этих процессов используется элегантная техника регистрации восстановления флуоресценции после обесцвечивания (ВФПО). Суть ее сводится к следующему. Сфокусированное посредством микроскопа лазерное излучение высокой интенсивности в течение малого промежутка времени воздействует на участок клеточной поверхности, связанный с определенным красителем. При этом происходит фотодинамическое разрушение красителя; облучаемая область обедняется флуоресцирующим веществом, в результате чего через некоторое время соседние, необесцвеченные молекулы диффундируют в данную область, восстанавливая флуоресценцию. Возбуждение флуоресценции в данный момент осуществляется с помощью ослабленного примерно в 10^3 раз лазерного излучения. Характер кривой восста-

новления несет в себе информацию о диффузионных свойствах липидов, гидрофобных пептидов, мембранных белков. Следует отметить высокую воспроизводимость метода ВФПО, отсутствие влияния облучения на диффузионные константы, морфологию клеточной мембраны и ее проницаемость.

Еще одна возможность воздействия на клетки сфокусированного лазерного излучения реализуется в процессе флуориметрии клеток в потоке. Принцип метода заключается в формировании потока из клеточной суспензии и пропускании через него лазерного излучения. При этом происходит измерение поглощения, рассеяния или флуоресценции клеток с последующей их сортировкой по определенным признакам. В последнем случае сигнал, полученный после взаимодействия сфокусированного лазерного луча с клеткой, управляет электронной системой, которая заряжает клетки. Обработанные таким образом клетки проходят через электрическое поле, отклоняясь в ту или иную сторону в соответствии с зарядом.

Лазерная микрофотометрия и микрофлуориметрия клеток в потоке используется для подсчета содержания ДНК и белков в клеточных популяциях, наличия вирусов в зараженных клетках, определения антигенов на клеточной поверхности. Возможен также анализ относительного содержания клеток, находящихся в различных стадиях развития. Метод позволяет изучать механизмы воздействия различных химических препаратов на клеточную активность, выявлять злокачественные клетки, белые кровяные тельца и т.д.

Эксперименты С.Чахотина по исследованию биоэлектрических токов у беспозвоночных получили свое развитие и в наше время. Так, следует отметить работы П.Г.Костюка, О.А.Крыштала с сотрудниками по расшифровке механизмов возникновения и распространения в клетке нервного импульса, связанного со способностью клеточной мембраны возбуждаться, т.е. создавать трансмембранный ионный ток за счет мгновенного изменения своей проницаемости. С точки зрения методики авторы использовали перфузию – произвольную замену внутриклеточной среды. Для этого ими была использована экспериментальная камера, позволяющая осуществлять полную замену внутриклеточной среды в изолированных клетках через поврежденный участок поверхности мембраны. Камера делится на две части перегородкой, в которой имеется микропора. Изолированная клетка с помощью микропипетки помещается в эту микропору. Клетку повреждают с нижней стороны, так что обе части камеры, по сути, разделены только клеточной мембраной. Система регистрации, состоящая из набора усилителей, позволяет фиксировать потенциал на мембране диализируемой клетки.

Развитием метода внутриклеточного диализа можно считать использование пластиковой микропипетки, согнутой под углом и проколотой полированной иглой в месте сгиба (Р.А.Крышталь, В.И.Пидопличко). К отверстию присасывается клетка, мембрана которой с внутренней стороны пипетки разрушается. Затем к клетке подводится вторая микропипетка (рис. 46). В итоге образуется система с двумя независимыми контурами перфузии внутриклеточного раствора. Измеряемые значения мембранного потенциала позволяют оценить кинетику кальциевых входящих токов и воротных токов кальциевых каналов.

Еще одно направление, связанное с исследованием фотоэлектрических процессов клетки, получило свое развитие в работах Ф.Ф.Литвина и О.А.Синещекова. Метод внеклеточной регистрации потенциалов на клетке, помещенной в микропипетку, позволяет изучить целый комплекс биоэлектрических реакций клетки на свет. В качестве объекта исследований была выбрана одноклеточная зеленая водоросль *Haematococcus pluvialis*. Были обнаружены два типа потенциалов – положительный, отражающий поверхностные свойства мембраны, и отрицательный, трансмембранный. Кроме того, выявлены строго периодические изменения положительного потенциала под действием света и быстрые обратимые изменения его уровня. Исследована кинетика процесса

генерации разности электрических потенциалов в

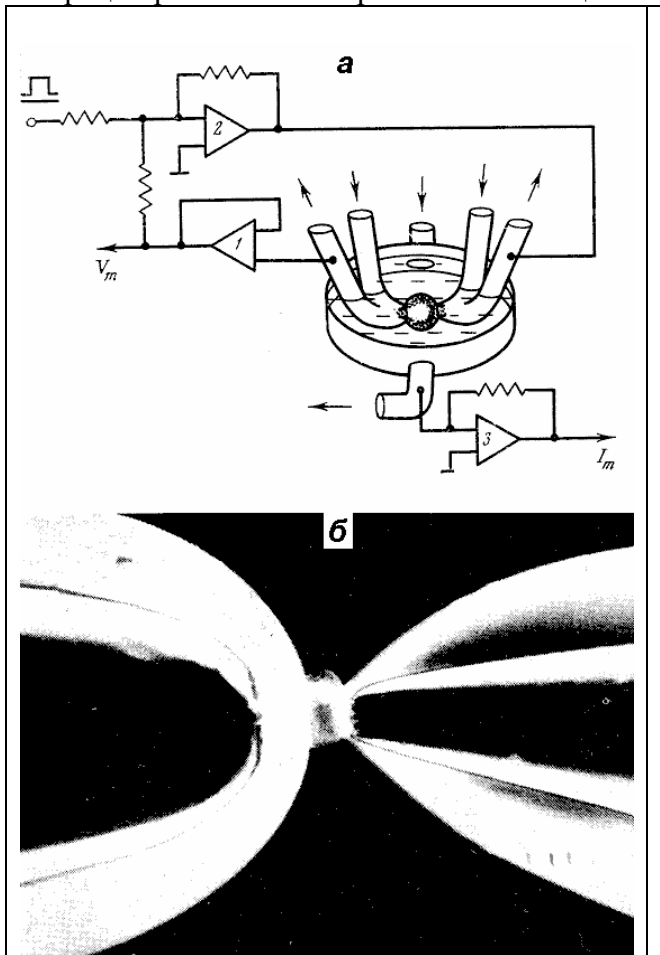


Рис.46. Метод внутриклеточной перфузии, разработанный О.А.Крышталем и В.И.Пидопличко. а. Перфузия с помощью двух пор. Схема установки: здесь 1 - входной усилитель; 2 - усилитель фиксации потенциала; 3 - усилитель тока; б. Микрофотография клетки, перфузируемой с помощью двух пор

зависимости от интенсивности и длительности светового стимула. Отмечена индуцируемая светом периодическая электрическая активность клетки при изменении направления движения. Спектр действия фотоиндукции рецепторного потенциала *Naematococcus pluvialis* в ответ на изменение направления распространения стимулирующего света (рис.47, 1) и изменение интенсивности света во времени (рис. 47, 2) идентичен по форме спектру действия двигательных реакций *Euglena gracilis* (рис.47, 3) и спектру поглощения галобактерий (рис.47, 4). Вместе с тем следует отметить четкие пики в измеренном спектре, что свидетельствует об участии более чем одного пигмента в фотодвижении водоросли.

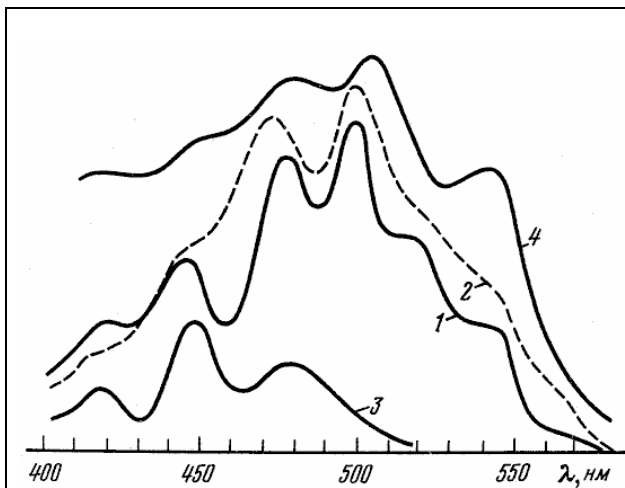


Рис. 47. Спектры действия фотоиндукции рецепторного потенциала фототаксиса (1) и прямой фотофобической реакции (2) у *Naematococcus pluvialis*, полученные О.А.Синещековым и Ф.Ф.Литвиным. Для сравнения представлены спектры действия обратной фотофобической реакции у *Euglena gracilis* (3) и спектр поглощения галобактерий (4)

Идеи С. Чахотина относительно возможности использования ионизирующих излучений для локальных воздействий на клетку и клеточные органеллы также реализованы в наше время. Хотелось бы упомянуть появившуюся в 1965 году работу А.А. Вайнсона, посвященную исследованию возможности микрооблучения животных клеток α -частицами. Для выделения узкого (4 мкм) пучка α -частиц автор использовал специально подготовленные диафрагмы, которые располагали в непосредственной близости от

исследуемых клеток HeLa; последние были выращены на тонких пластинах слюды или лавсановой пленке. Целью исследования было изучение роли поражения цитоплазмы и ядра в метаболизме клеток HeLa после микрооблучения. Экспериментальная установка представляла собой микроскоп, на предметном столике которого устанавливали исследуемый объект и диафрагму. Была предусмотрена возможность замены тубуса микроскопа, с помощью которого осуществляли наблюдения за объектом, на источник ионизирующего излучения (полониевый, 2-7 мккюри/мм²). Измерения и дозиметрию α -пучка производили путем фотографирования. Разработанная установка позволила установить, что при облучении как всей клетки, так и только ядра дозовая кривая синтеза ДНК является двухкомпонентной, причем в обоих случаях точка перегиба соответствует одинаковым дозам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, читатель ознакомился с основными вехами жизненного пути и научной деятельности замечательного ученого-биофизика, нашего соотечественника Сергея Степановича Чахотина. Будучи пионером в области использования техники микроманипулирования, ультрафиолетового микрооблучения и ряда приемов в электрофизиологии, С. Чахотин добился результатов, которые продолжают удивлять и воодушевлять исследователей живой клетки и в наше время. Вызывает искреннее восхищение, высокая экспериментальная культура ученого, его новаторский подход к решению методических проблем (напомним, что начал С. Чахотин свою активную научную деятельность в 1912 году), его скрупулезность в попытках проанализировать результаты. Многие идеи и технические решения С. Чахотина получили свое развитие в разнообразных современных приборах и методах. С уважением относимся мы к его общественно-политической деятельности, в основе которой лежит высокая гражданская убежденность, гуманистические позиции и ответственность ученого.

В процессе поисков материалов и документов, освещающих жизнь и деятельность С. Чахотина, автор обращался во многие организации. Хотелось бы с искренней теплотой поблагодарить Т.М. Турпаева (Москва), Р.И. Буряк (Москва), В.С. Кальний (Ленинград), А.С. Данилова (Алма-Ата), А.Ю. Буданцева (Пушино), а также работников Российской государственной библиотеки и Библиотеки по естественным наукам РАН за оказанную помощь.

Автор дает себе отчет в том, что, возможно, не все грани яркого таланта С. Чахотина раскрыты в одинаковой степени и с глубокой благодарностью воспримет как критические замечания по содержанию книги, так и новые, неосвещенные в ней сведения о замечательном ученом – Сергее Степановиче Чахотине.

БИБЛИОГРАФИЯ ТРУДОВ С.С. ЧАХОТИНА 1904-1959

1. Чахотин С.С. О доставке половых продуктов морских ежей живыми в Петербург для экспериментально-биологических целей // Изв. имп. Акад. наук. 1904. Т. VII. №10. С. 737.

2. Чахотин С.С. Изучение локализованных воздействий ультрафиолетовых лучей на живую клетку методом микроукола // Цитология.1959.Т.1.№6.С.614-626.
3. Tschachotin S. Ober die bioelektrischen Strome bei Wirbellosen und deren Vergleich mit analogen Erscheinungen bei Wirbeltieren //Pfl.Arch.ges.Physiol.1907.B.120.S.565.
4. Tschachotin S. Die Statocyste der Heteropodon. Leipzig: Tese du doctorat //Ztschr. wiss. Zool. 1908. B.XC.S.343
5. Tschachotin S. Eine Mikrooperationsvorrichtung //Zs.wiss.Mikrosk.1912. B.29.S.188.
6. Tschachotin S.Die mikroskopische Strahlenstichmethode, eine Zelloperationsmethode //Biol. Zentralbl. 1912.B. 32.S.623-630.
7. Tschachotin S..Uber Strahlenwirkung auf Zellen, speziell auf Krebsgeschwulstzellen und die Frage der chemischen Imitation derselben // Munch.Medizin.Wochenschr.1912. No.44.S.2379-2381.
8. Tchakhotine S. Action localisee des ayons ultraviolets sur le novau de l'oeuf de l'oursin par radiopuncture microscopique // C.r. Soc.Biol.1920.V.83.P. 1593-1595.
9. Tchakhotine S. Les changements de la permiablete de l'oursin localisee experimentalement // C.r. Soc. Biol. 1921.V.84.P. 464-466.
10. Tchakhotine S. Sur le mecanisme de l'action das rayons ultraviolets sur la cellule //Ann.Inst.Pasteur.1921.V.35.P.321-325.
11. Tchakhotine S. Attivazione dell'uovo di riccio di mare per mezzo della microraggiopuntura // Boll.Soc.Ital.biol.sper.1929. V.4.N 1.P. 475-479.
12. Tchakhotine S. La leucocitosi come reazione-indice nel cancro da trapiante del topi e ratti bianchi // Boll.Soc.Ital.boil.sper. 1929.V.4. P.470.
13. Tchakhotine S. Studi sulla leucocitosi nel cancro del topi. I.Sulla natura della reazione leucocitaria //Boll.Soc.Ital.biol.sper. 1929,. V.4. P.571.
14. Tschachotin S. Rationelle Organisation von biologischen Instituten //Abderhalden's Handbuch der biolog. Arbeitmethoden. 1930. V.2/2.
15. Tschachotin S. The crisis in scientific research and the way out // Science.1933.V.77.P.426.
16. Tchakhotine S. Sur le mecanisme de la reaction de la couche superficielle de l'oeuf de la Pholade ala micropuncture ultraviolette // C.r.Soc.biol. 1935.V.120. P.714.
17. Tchakhotine S. La partenogenes artificielle de l'oeuf de la Pholade par micropuncture ultraviolette //C.r.Soc.biol.1935. V.119.P.1394.
18. Tschachotin B. Die Mikrostrahlsichmethode und andere Methoden des zytologischen Mikroexperimentes //Handb.boil. Arbeitsmethoden Abderhalden. 1935.Abt.Y. B.10. S.877-958.
19. Tchakhotine S. La micro-instrumentation pour les recherches de Cytologie experimentale // Bull. soc.Franc.Microsc.1935. V.4. P.138-153.

20. Tchakhotine S. L'effet d'arret la fonction de la vacuole pulsatile de la Paramecie par micropuncture ultraviolette //C.r.Soc.biol.1935. V.120. P.782-784.
21. Tchakhotine S. Suppression de la fonction du coeur de la Daphnie par la micropuncture ultraviolette // C.r.Soc.biol. 1935. V.119. P.1392.
22. Tchakhotine S. Flocculation localisee des colloides dans la cellule par la micropuncture ultraviolette // C.r.Acad.Sci.1935.V.200. P.2036-2038.
23. Tchakhotine S. Recherches physiologiques sur les Protozoaires, faites au myen de la micropuncture ultraviolette //C.r.Acad.Sci. 1935. V.200. P.2217.
24. Tchakhotine S. Les Protozoaires, objets d'experiences en Cytologie experimentale (Recherches faites avec la micropuncture ultraviolette). Ann. protistol. 1936. V.5. P.1.
25. Tchakhotine S. La fonction du stigma chez le Flagelle Euglena, etudiee au moyen de la micropuncture ultraviolette // C.r.Soc.biol.1936. V.121. P.1162-1165.
26. Tchakhotine S. Recherches de Cytologie experimentale dans leurs rapports avec le probleme du Cancer // Le lutte contre le Cancer. 1936. No.52.
27. Tchakhotine S. Irradiation localisee du myoneme du pedoncule des Vorticelles par micropuncture ultraviolette // C.r.Acad.Sci.1936. V.202. P.1114.
28. Tchakhotine S. Sur les variations de l'equilibre entre cytoplasme et vacuome chez Ascoidea rubescens, par irradiation au moyen de la micropuncture ultraviolette // C.r.Soc.biol.1956. V.121. P.952.
29. Tchakhotine S. Sur les reactions du cytoplasme et du vacuome a la micropuncture ultraviolette chez Ascoidea rubescens en fonction du pH du millieu de la permeabilite // C.r.Soc.biol. 1936. V.121. P.1525.
30. Tchakhotine S. Etudes physiologieiques et embryologiques au moyen de la methode des microgouttes // Trav. Station zool.Wimereux (Vol. jubilaire Maurice Gaullery).1938. V.13. P.647-663
31. Tchakhotine S. Ultramicropuncture ultraviolette, moyen nouveau d'etude de phenomenes colloidaux dans la cellule vivante // C.r.Acad.sci. 1938. V.206.P.133.
32. Tchakhotine S. Reactions "conditionnees" par micropuncture ultraviolette dans le comportement d'une cellule isolee (*Paramecium caudatum*) // Arch. Inst.prophylactique. Paris.1938. V.10. P.119.
33. Tchakhotine S. Parthenogenese experimentale de l'oeuf de la Pholade par micropuncture ultraviolette, aboutissant a une larve vivante // C.r.Acad.sci.1938. V.106. P.377.
34. Tchakhotine S. Une technique simple d'entretien des souris au taboratoir // C.r.Soc.biol.1938. V.127. P.226.
35. Tchakhotine S. Heredite du taux leucocytaire du sang chez la Souris // C.r.Acad.sci.1938. V.236. P.533.
36. Tchakhotine S. Leucocytose et cancers spontanés, greffés et provoqués chimiquement par le 3-4-benzopyrene // C.r.Soc.biol.1938. V.127.P.415.

37. Tchakhotine S. Cancer au 3-4-benzopyrene et reaction leucocytaires chez la Souris // C.r.Soc. biol. 1938. V.127. P.606.
38. Tchakhotine S. Organisation rationnelle de la Recherche Scientifique (Ed.Hermann).Paris. 1956.
39. Tchakhotine S. Experiences de micropuncture ultraviolette sur les blastomeres de l'oeuf de Pholades (Ph. Candida et Ph. crispata) // C.r.Soc.boil. 1938.V.127. P.200.
40. Tchakhotine S. Cancerisation experimentale des elements embryonnaires, obtenue sur des larves d'Oursins // R.r.Soc.biol.1938. V.127. P.1195.
41. Tschachotin S. Experimentelle Kanalisierung von Embryonalzellen // Archiv fur experiment. Zellforschung. 1939. Bd.22. S.422.
42. Tchakhotine S. Le Viol des Foules par la propaganda politique (Ed.Gallimard). Paris. 1939. 1-re edition.
43. Tchakhotine S. The rape of the Masses (Ed.Routledge).Labour Book Service. Londonп. 1940.
44. Tchakhotine S. Le Viol des Foules par la propagande politique (Ed.Gallimard). Paris. 1952. 2-me edition.
45. Tchakhotine S. Problemi e metodi di Citologia sperimentale // Boll.Soc. Ital.biol.sperimentale. 1955. V.31. P.661.
46. Benedicanti A., Tchakhotine S. Azione di alcuni farmaci sugli esseri unicellulari // Rendiconti dell'Academia Nazionole dei Lincei. 1956. Serie VIII. V. 20. P.19

ИМЕННОЙ УКАЗАТЕЛЬ

- | | |
|-----------------|-------------------|
| Байер А. | Кончаловский М.П. |
| Бернес М. | Коссель А. |
| Вессис М. | Костюк П.Г. |
| Бобров Л.В. | Красин Л.Б. |
| Богомолец А.А., | Крышталь О.А. |
| Булгаков М. | Ленчи Г. |
| Бочли О. | Лидин В. |
| Вайнсон А.А. | Литвин Ф.Ф. |
| Воровский В.В. | Мандельштам О.Е. |
| Гааз Э.В. | Омелаева С.Н. |
| Гаводан П. | Орбели Л.Д. |
| Гамалея Н.Ф. | Осипов Д.В. |
| Гертвиг О. | Павлов И.П. |
| Гертвиг Р. | Парибок В.П. |
| Гетти Ф. | Петров Е.П. |
| Дубров А.П. | Плеханов Г.В. |
| Иоффе А.Ф. | Пидопличко В.И. |
| Кампани Э. | Полакко Э. |
| Катаев В.П. | Полянский Ю.И. |
| Коломбетти Дж. | Рентген В.К. |

Романов С.
Сакки К.А.
Сахаров В.Н.
Свенчанская А.М.
Синещеков О.А.
Соколов И.И.
Толстой А.Н.
Топчиев А.В.
Узденский А.В.
Федин К.А.
Ферсман А.В.

Фокин С.И.
Чахотин А.С.
Чахотин В.С.
Чахотин Е.С.
Чахотин И.С.
Чахотин С.С.
Черни В.
Чичерин Г.В.
Шишко Е.Д.
Эйнштейн А.
Энгельманн Т.

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Бобров Л.В. Тени невидимого света. М.: Атомиздат, 1964. 112 с.

Вайнсон А.А. Установка для локального облучения животных клеток микропучком α -частиц // Радиобиология, 1965. т.5. вып.5. с.752-756.

Гамалея Н.Ф. Применение излучения лазеров в цитологических исследованиях. Фотобиология животной клетки. Ленинград : Наука, 1979. с.194-200.

Дубров А.П. Современное развитие метода ультрафиолетового микрооблучения в биологии // Биофизика. 1962. т.7, вып. 4. с. 634-639.

Квасов Д.Г., Федорова-Грот А.К. Физиологическая школа И.П.Павлова. Ленинград: Наука, 1967. с. 267-268.

Коломбетти Дж., Гетти Фр., Ленчи Фр., Полакко Э., Посудин Ю.И., Кампани Э. Лазерная микроспектрофлуориметрия фотопигментов *in vivo*. Квант.электроника. 1981.Т.8, № 12. с.2680-2683.

Костяк П.Г., Крышталь О.А. Механизмы электрической возбудимости нервной клетки. М.: Наука. 1981. 204 с.

Посудин Ю.И. Лазерная микрофлуориметрия биологических объектов. Киев. Вища школа, Головное изд-во, 1985. 106 с.

Посудин О.И. Лазерная фотобиология. Киев: Вища школа, Головное изд-во, 1989, 246 с.

Сахаров В.Н. Исследование живой клетки методом ультрафиолетового и лазерного локального облучения. Успехи современной биологии. 1972. т.73. вып. 2. с.231-249.

Синещеков О.А., Литвин Ф.Ф. Механизмы фототаксиса микроорганизмов, В кн.: Молекулярные механизмы биологического действия оптического излучения. М. Наука. 1988, с.212-227.

Узденский А.В. О селективности и локальности воздействия при лазерном микрооблучении клеток. Цитология. 1982. т.24. №10. с.1119-1132.

Фокин С.И., Осипов Д.В. Влияние локального УФ-микрооблучения на ядерный аппарат и цитоплазму инфузорий *Paramecium caudatum*. Цитология. 1975. т.17. №9. 1073-1080

Харьковский А. "На семи ветрах". Соц.индустрия, 5 сентября 1971 г.

Шишко Е.Д. Лазерное микрооблучение клетки. Труды Всесоюзной конференции "Применение методов и средств лазерной техники в биологии и медицине". Киев, 1981. с.140-147.

Ваши замечания о содержании книги просим присылать по адресу:

проф.Посудину Юрию Ивановичу

Национальный аграрный университет, кафедра биофизики,

ул. Героев Обороны, 15, Киев, 03041, Украина e-mail: posudin@nauu.kiev.ua

Address for correspondence: Prof. Dr. Yuriy Posudin,

National Agricultural University, Department of Biophysics, Geroiv Oborony St., 15, Kyiv, 03041, Ukraine