

Г. Г. ГАСПАРЯН, Ю. А. МАГАКЯН, В. В. ТЕРСКИХ

## ЦИТОСПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКОВЫХ SH-ГРУПП В КУЛЬТУРЕ ДИПЛОИДНЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ПРИ ИНДУКЦИИ КЛЕТОЧНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ

Проведено цитофотометрическое определение концентрации и содержания белковых SH-групп в культуре диплоидных фибробластов эмбриона человека. Показано, что при переходе культуры из логарифмической фазы роста в стационарную концентрация белковых SH-групп в клетках снижается на 22%. В первые 4 часа после индукции клеточной пролиферации путем смены среды наблюдается резкое повышение концентрации SH-групп, значительно превышающее их концентрацию в стационарной и логарифмической фазах роста культуры; это увеличение является общей для всех клеток реакцией на действие стимулятора даже в том случае, если в митотический цикл вступает небольшая доля клеточной популяции.

Среди функциональных групп белковых молекул давно привлекают внимание сульфгидрильные группы остатков цистеина. Это объясняется, с одной стороны, высокой реакционной способностью SH-групп, а с другой — их большим значением для специфического функционирования белков. Сдвиги в содержании белковых SH-групп могут отражать изменения внутриклеточного окислительно-восстановительного потенциала и активности ферментных систем клетки [7].

Особый интерес представляет исследование роли SH-групп в эмбриогенезе, так как известно, что вещества, содержащие SH-группы, нередко проявляют себя как индуцирующие агенты в процессе первичного организующего воздействия [11, 16, 18]. Как показали исследования с использованием 2-меркаптоэтанола, являющегося восстановителем дисульфидных групп в сульфгидрильные [1, 11], его действие проявляется не только в тератогенетических реакциях, но и в задержке роста эмбриона. Однако вопрос об участии SH-соединений в процессах собственно клеточного роста до настоящего времени остается неясным. Изучению этого вопроса посвящено настоящее исследование.

Однако трактовка данных, полученных в опытах на эмбрионах *in toto*, часто бывает затруднена наложением большого числа взаимосвязанных реакций в интегральной системе. Поэтому для данной цели предпочтительнее более простые модельные системы, например, стационарная культура клеток, индуцированная к пролиферации. Известно, что в первые часы после воздействия индуктора в такой культуре увеличивается скорость синтеза РНК и белка [5, 19—21], возрастает матричная активность хроматина [13], усиливается транспорт уридина и фосфатов

внутри клетки [12] и сдвигается ее ионное равновесие [6]. Все это свидетельствует о глубоких физиологических перестройках, имеющих место при переходе клеток из состояния покоя к активной пролиферации. В настоящей работе с помощью абсорбционной фотометрии прослежены сдвиги в содержании и концентрации белковых SH-групп в диплоидных эмбриональных фибробластах человека на экспоненциальной и стационарной фазах роста культуры, а также при индукции пролиферации путем смены среды.

*Материал и методика.* Диплоидные эмбриональные фибробласты человека выращивали в среде Игла с добавлением 35% гидролизата лактальбумина, 3% сыворотки крупного рогатого скота и 100 мкг/мл канамицина. Для экспериментов суспензию клеток (50 тыс./мл) наливали по 2 мл в пенициллиновые флаконы с покровными стеклами. Поскольку при выращивании в питательной среде полного состава клетки образуют многослойные культуры [14], что затрудняет наблюдения, через сутки после посева исходная среда заменялась средой без сыворотки. С целью индукции клеточной пролиферации на 7—8-е сутки роста культуры (стационарная фаза роста) старая питательная среда заменялась свежей, содержащей 10% сыворотки.

Для изучения характера роста культуры со вторых по седьмые сутки клетки ежедневно метились  $\text{H}^3$ -тимидином с конечной активностью 1 мккюри/мл (уд. активность 4 кюри/мМ) в течение 20 мин (на каждый срок исследовали по 8 препаратов). Кроме того, включение меченого тимидина также в течение 20 мин определяли через 6, 14 и 22 час. после смены среды в стационарной культуре клеток (по 5 препаратов на каждый срок). Для определения индекса меченых клеток и митотического индекса на автографах подсчитывали по 1000 клеток; плотность клеточного слоя выражали числом клеток в поле зрения микроскопа (среднее из 50 измерений).

Цитохимическое выявление SH-групп проводилось путем обработки препаратов 2,2'-диокси-6,6'-динафтилдисульфидом (ДДД) и последующего окрашивания солью диазония (прочным черным К) по Бару [9]. Определение количества SH-групп в клетках проводилось на зондовом цитофотометре одноволновым методом при длине волны 540 нм. Содержание SH-групп на клетку вычислялось путем перемножения значений оптической плотности (среднее из 5 измерений на клетку, 50 клеток на срок) на величину площади клетки и выражалось в условных сравнимых единицах.

*Результаты и обсуждение.* Согласно данным, приведенным на рис. 1, на вторые сутки роста культура эмбриональных фибробластов человека находится на стадии экспоненциального роста; меченые клетки составляют 32% популяции. Плотность клеточного слоя достигает максимума к третьим суткам роста, а к пятым суткам индекс меченых клеток снижается до 2,5% при митотическом индексе не более 0,1%. На основании этого можно считать, что к 5—7-м суткам культура клеток выходит в стационарную фазу роста.

Снижение пролиферативной активности культуры на седьмые сутки роста по сравнению со вторыми сутками сопровождается увеличением размеров клеток, площадь которых возрастает на 47%. При этом концентрация белковых SH-групп снижается на 22%, и на столько же возрастает их содержание (табл. 1). Очевидно, что увеличение содержания белковых SH-групп определяется накоплением белка в клетках; снижение же внутриклеточной концентрации SH-групп, возможно, свидетельствует об уменьшении их количества на единицу массы белка. По-види-

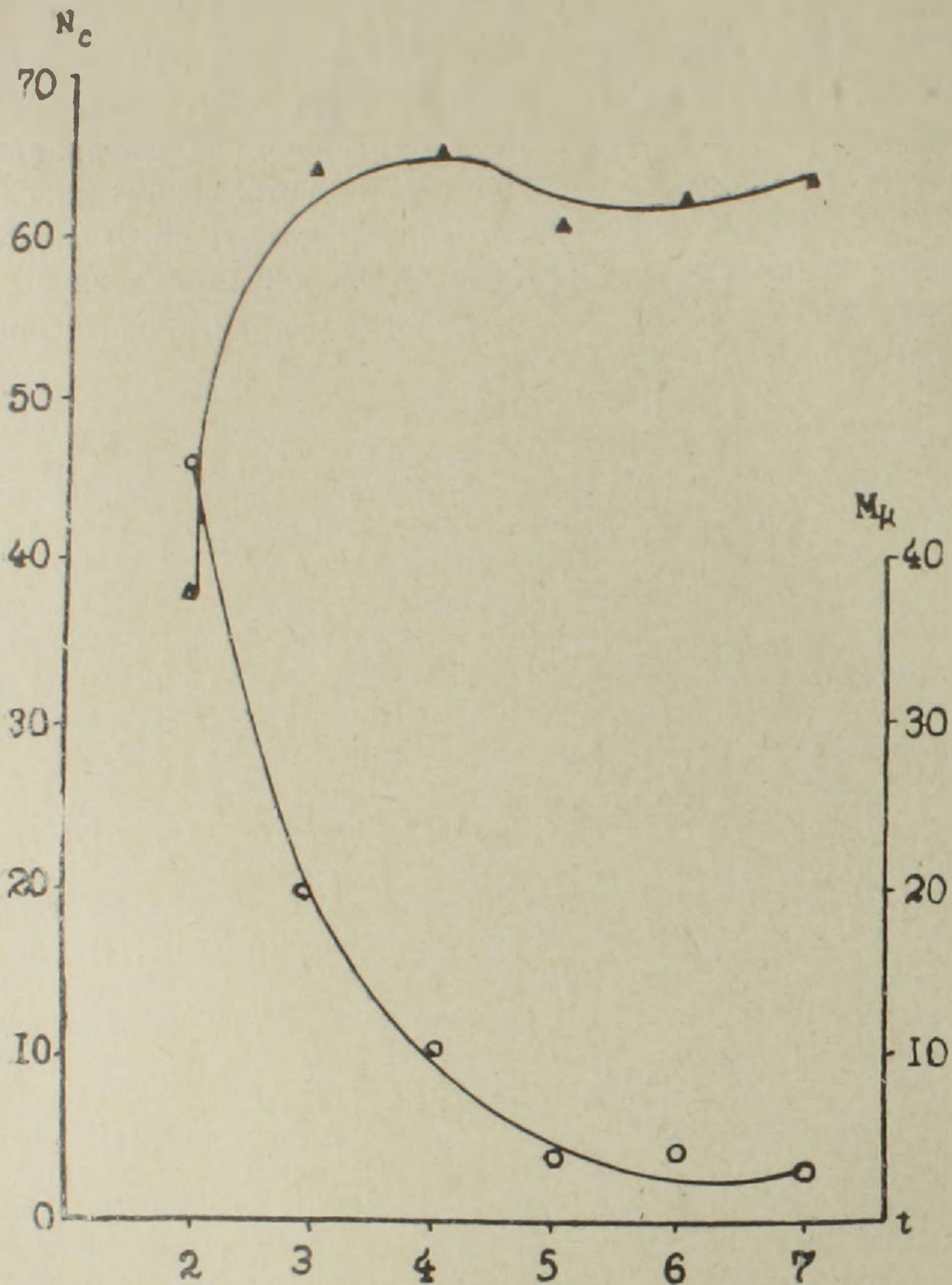


Рис. 1. Изменения плотности клеточного слоя и индекса меченых клеток в культуре эмбриональных фибробластов человека, растущей на среде без сыворотки. По оси ординат: слева—число клеток в поле зрения, справа—индекс меченых клеток (в %). По оси абсцисс: время роста культуры (в сутках). Условные обозначения: ▲ — число клеток в поле зрения; ○ — индекс меченых клеток.

тому, обнаруженное различие между покоящимися и пролиферирующими клетками в отношении белковых SH-групп является отражением физиологических особенностей этих двух состояний клеток и не связано прямо с изменением массы белка. Иная ситуация имеет место в растущих неделящихся клетках (клетки Пуркинье мозжечка эмбрионов кур). В этом случае концентрация белковых SH-групп остается постоянной, а повышение их содержания в клетках пропорционально увеличению размеров клеток [3].

При индукции клеточной пролиферации в стационарной культуре резкое увеличение концентрации и содержания белковых SH-групп происходит уже в первые 30 мин после смены среды. Оба показателя сохра-

Таблица 1

Различия в концентрации и содержании белковых SH-групп и размерах клеток в экспоненциальной и стационарной фазах роста культуры

Фаза роста культуры	Концентрация SH-групп в клетках	Площадь клеток	Содержание SH-групп на клетку
Экспоненциальная (вторые сутки)	17,73±0,66	0,66±0,04	11,63±0,71
Стационарная (седьмые сутки)	14,56±0,57	0,97±0,05	14,14±0,87

няются на высоком уровне до 4 час. ( $P < 0,01$ ), после чего снижаются, приближаясь к значениям, полученным для стационарной культуры клеток, оставаясь на этом низком уровне до 14 час. Через 22 час. после смены среды наблюдается новое увеличение концентрации и содержания белковых SH-групп в стимулированных клетках (табл. 2, рис. 2).

Таблица 2

Изменения в концентрации и содержании белковых SH-групп и размеров клеток при индукции пролиферации в стационарной культуре клеток

Время после смены среды, час.	Концентрация SH-групп в клетках	Площадь клеток	Содержание SH-групп на клетку
0	14,56±0,57	0,97±0,05	14,14±0,87
0,5	20,67±0,81	0,96±0,05	19,85±1,04
2,0	22,10±1,00	1,04±0,07	23,03±1,73
4,0	23,93±0,57	1,07±0,08	25,67±1,38
6,0	15,14±0,37	1,09±0,05	16,51±1,02
14,0	15,64±0,62	1,04±0,06	16,29±0,86
22,0	17,81±0,54	1,34±0,08	23,85±1,58

Возрастание содержания белковых SH-групп в клетках в первые часы после смены среды практически не сопровождается изменением размеров клеток и объясняется значительным, даже по сравнению с экспоненциальной фазой роста, увеличением концентрации SH-групп. Приблизительно в те же сроки, в первые 4—6 час. после смены среды, в стимулированных клетках происходят глубокие изменения, заключающиеся в увеличении проницаемости цитоплазматической мембраны, активации хроматина, усилении макромолекулярных синтезов и других событиях [2, 4]. Эти процессы предшествуют вступлению покоящихся клеток в митотический цикл, характеризуя период трансформации покоящихся клеток в пролиферирующие [5]. По всей вероятности, в один ряд с вышеописанными явлениями можно поставить и обнаруженное нами возрастание уровня белковых SH-групп в процессе индукции пролиферации клеток, которое нельзя объяснить увеличением содержания белка в клетке. Скорее, это возрастание отражает падение внутриклеточного окислительно-восстановительного потенциала, приводящее к восстановлению дисульфидных связей в белковых молекулах, а также между белковыми

и небелковыми тиоловыми группами [9, 10, 17]. Это в свою очередь должно приводить к активации многих ферментных систем клетки [8], что хорошо согласуется с усилением макромолекулярных синтезов, наблюдаемым при индукции клеточной пролиферации.

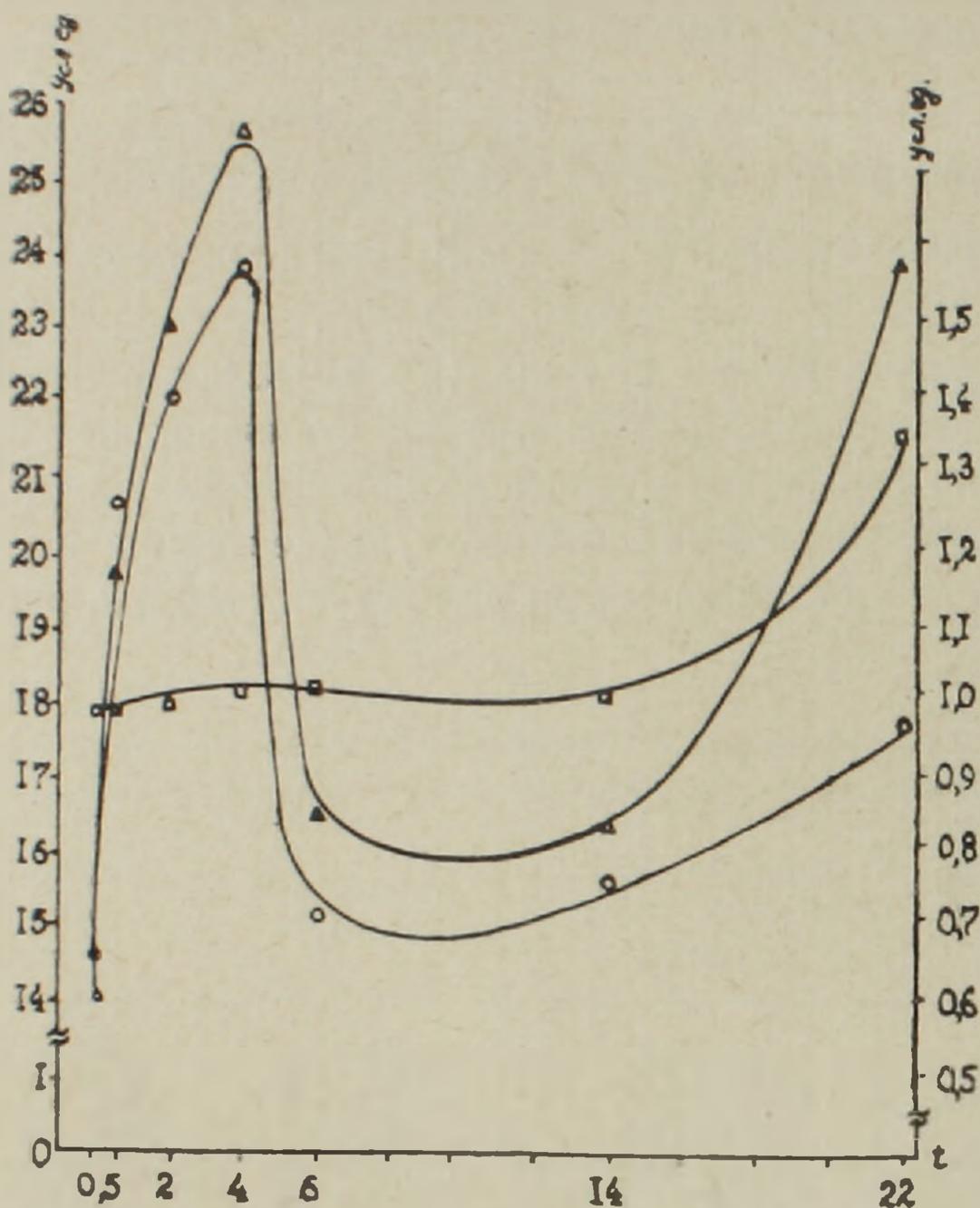


Рис. 2. Динамика уровня белковых SH-групп и размеров клеток в культуре эмбриональных фибробластов человека в процессе индукции клеточной пролиферации путем смены среды. По оси ординат: слева — концентрация и содержание SH-групп на клетку (в усл. ед.), справа — размеры клеток (в усл. ед.). По оси абсцисс — время роста культуры после смены среды (в часах). Условные обозначения:  $\Delta$  — содержание SH-групп;  $\circ$  — концентрация SH-групп;  $\square$  — размеры клеток.

Сходные данные были получены относительно небелковых SH-групп на клетках асцитной опухоли Эрлиха [15]. При трансплантации интактным мышам покоящихся асцитных клеток в последних наблюдалось значительное увеличение содержания небелковых SH-групп, происходившее в процессе индукции пролиферации.

В изучаемой нами культуре эмбриональных фибробластов фракция клеток, вступающая в период синтеза ДНК после смены среды, относительно невелика: через 22 часа индекс меченых клеток составлял всего 12%. Увеличение же количества белковых SH-групп происходит практически во всех клетках (рис. 3). Сходные данные были получены для фибробластов человека в отношении синтеза РНК [19]. Было показано,

что усиление синтеза РНК в первые часы после смены среды также происходит во всех клетках, тогда как в период синтеза ДНК вступает только 10% клеток.

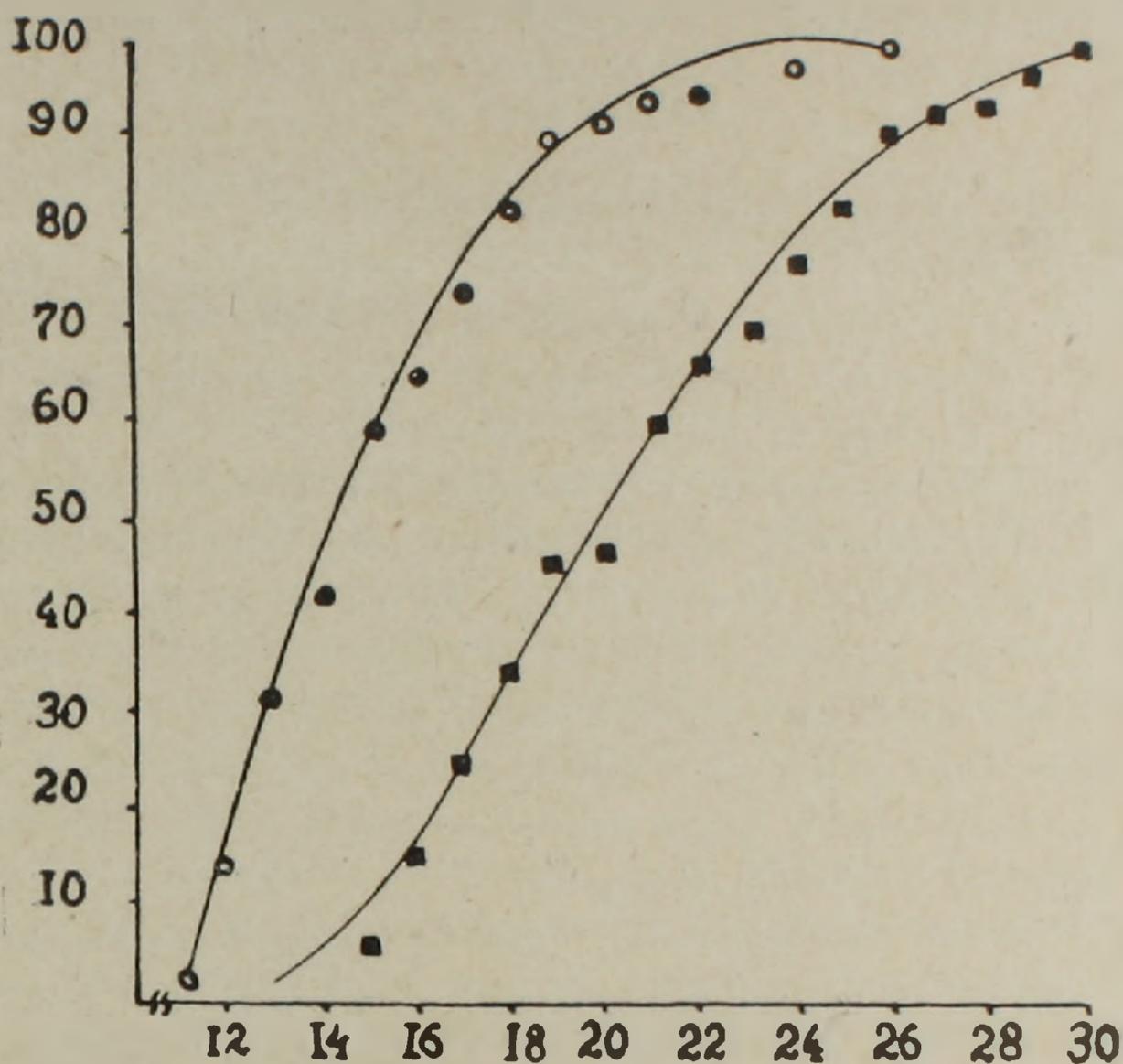


Рис. 3. Кумулятивные кривые распределения по концентрации белковых SH-групп в эмбриональных фибробластах человека в стационарной культуре и через 4 часа после смены среды. По оси ординат: число клеток с концентрацией SH-групп, равной или меньшей данной (в %). По оси абсцисс: концентрация белковых SH-групп (в усл. ед.). Условные обозначения: о — стационарная культура клеток; □ — культура клеток через 4 часа после смены среды.

Полученные результаты позволяют предположить, что повышение уровня белковых SH-групп в клетках отражает падение внутриклеточного окислительно-восстановительного потенциала в периоде трансформации покоящихся клеток в пролиферирующие; наблюдаемые изменения являются общей реакцией клеток на стимул к пролиферации, даже если этот стимул не приводит к вступлению всех клеток в митотический цикл.

Институт зоологии

АН АрмССР

Институт молекулярной биологии

АН СССР

Поступило 25.VII 1973 г.

Գ. Հ. ԳԱՍՊԱՐՅԱՆ, Յու. Հ. ՄԱՂԱՔՅԱՆ, Վ. Վ. ՏԵՐՍԿԻՆ

ՖՈՒՆԿՑԻՈՆԱԿԱՆ ՏԱՐԲԵՐ ՎԻՃԱԿՆԵՐՈՒՄ ԳԻՊԼՈՒԴ ԷՄԲՐԻՈՆԱԿԱՆ ԲՋԻՋՆԵՐԻ ԿՈՒԼՏՈՒՐԱՅՈՒՄ ՍՊԵՏԱԿՈՒՅՑՆԵՐԻ ՏՈՒՆՄԵՐԻ ՊԱՐՈՒՆԱԿՈՒԹՅԱՆ ՑԻՏՈՍՊԵԿՏՐՈՖՈՏՈՄԵՏՐԻԿ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Ա մ փ ո փ ու մ

Քանակական ցիտոքիմիայի մեթոդներով որոշվել են սպիտակուցային խմբերի կոնցենտրացիան և քանակը մարդու սաղմի դիպլոիդ ֆիբրոբլաստներում աճման էքսպոնենցյալ և ստացիոնար ֆազաներում, ինչպես նաև ստացիոնար կուլտուրայում պրոլիֆերացիայի ինդուկցիայից հետո՝ սինթեզային միջավայր վերածելով լիարժեք միջավայրի:

Ստացիոնար կուլտուրայում SH-խմբերի կոնցենտրացիայի և քանակի ամենացածր մակարդակը նկատվում է աճման 7-րդ օրը: Աճի էքսպոնենցյալ ֆազայում այդ ցուցանիշը մոտավորապես 22%-ով բարձր է: Պրոլիֆերացիայի ինդուկցիայից անմիջապես հետո (30 րոպ — 4 ժամ) նկատվում է SH-խմբերի մակարդակի խիստ բարձրացում (ավելի քան 1,5 անգամ): Միջավայրի փոփոխումից վեց ժամ հետո այդ մակարդակը իջնում է մինչև ըսկրզենական ցուցանիշները և նորից բարձրանում մինչև 22-րդ ժամը, երբ նրկատվում է բջիջների չափսերի մեծացում:

Պրոլիֆերացիայի ինդուկցիայից հետո SH-խմբերի մակարդակի առաջին իսկ աճը ընթանում է բջիջների չափսերի կայունության ֆունկցիոնալ և կապված է հավանաբար՝ ֆերմենտների ակտիվության փոփոխությունների հետ, ստացիոնար վիճակից դեպի պրոլիֆերացիա անցման հետևանքով:

Ենթադրվում է, որ SH-խմբերի այս դինամիկան բնորոշում է տրանսֆորմացիայի այն ժամանակամիջոցը, երբ հանգստի վիճակում գտնվող բջիջները ձևափոխվում են բազմացող բջիջների:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Гаспарян Г. Г., Магакян Ю. А., Петросян А. В. Зоологический сборник, 17, 1974 (в печати).
2. Зосимовская А. И. Клеточный цикл. М., 104—133, 1973.
3. Каралова Е. М., Магакян Ю. А. ДАН АрмССР, 1974 (в печати).
4. Терских В. В. Клеточный цикл. М., 165—189, 1973.
5. Терских В. В., Зосимовская А. И., Абуладзе М. К. Цитология, 16, 1974 (в печати).
6. Терских В. В., Маленков А. Г. Цитология, 15, 7:868—874, 1973.
7. Торчинский Ю. М. Успехи совр. биол., 66, 1(4): 13—21, 1968.
8. Торчинский Ю. М. Сульфгидрильные и дисульфидные группы белков. М., 1971.
9. Bahr G. F. In: Introduction to Quantitative Cytochemistry. N.-Y.-L., 1966.
10. Barron E. S. G. Ann. N.-Y. Acad. Sci., 59: 574—594, 1955.
11. Brachet J. Adv. in morphogenesis, 3: 247—300, N.-Y.-L., 1964.
12. Cunningham D. D., Pardee A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 64: 1049—1056, 1969.
13. Farber J., Rovera G., Baserga R. Biochem. J., 122: 189—195, 1971.
14. Elsdale T., Bard J. Nature, 236, 5343: 152—155, 1972.
15. Harris J. W., Patt H. M. Exp. Cell Res., 56: 134—141, 1969.
16. Mazia D. Mitosis and the Physiology of Cell Division. N.-Y.-L., 1961.
17. Modig. Biochem. Pharmacol., 17: 177—183, 1969.
18. Rao K. V. Roux' Arch., 163: 161—165, 1969.
19. Rhode S. L., Ellem K. A. Exp. Cell Res., 53: 184—191, 1968.
20. Todaro G. J., Lazar G. K., Green H. J. cell. compar. physiol., 66: 325—334, 1965.
21. Todaro G. J., Matsuja Yu., Bloom S., Robbins A., Green H. In: Growth Regulating Substances for Animal Cells in Culture, Phil., 87—98, 1967.