

УДК 576.3.591.465.1:595.752

ЦИТОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ И КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКОВЫХ SH-ГРУПП В ЦИТОПЛАЗМЕ ООЦИТА И ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК В ООГЕНЕЗЕ АРАРАТСКОЙ КОШЕНИЛИ

М. Г. ХАЧАТРЯН

Методами цитофотометрии определяли концентрацию и содержание белковых SH-групп в ооците и вспомогательных клетках араратской кошенили. Показано, что их динамика в оогенезе зависит от изменений в концентрации и содержании суммарного белка и функционального состояния клеток. Удельная концентрация SH-групп в ооците, трофоцитах и фолликулярных клетках меняется по-разному. В ооците она не зависит от общей концентрации SH-групп и определяется, по-видимому, качественным составом суммарного белка. В трофоцитах изменяется в зависимости от изменения концентрации и содержания SH-групп, отражая их функциональное состояние. В фолликулярных клетках этот показатель находится в прямой зависимости от общей концентрации SH-групп и также отражает функциональное состояние этих клеток.

Ключевые слова: кошениль араратская, SH-группы, цитоплазма, ооплазма.

Известно, что тиоловые соединения, 70—97% которых составляют сульфгидрильные группы [13], являются необходимым компонентом многих ферментов и структурных белков [4]. Активность ряда ферментов зависит от состояния их SH-групп: при блокировании SH-групп (или группы) фермента утрачивается его ферментативная активность [8]. Большинство известных в настоящее время внутриклеточных ферментов, в том числе все изученные дегидрогеназы, многие другие окислительные ферменты, ферменты обмена аминокислот, углеводов, жиров, биосинтеза белков и т. д., ингибируются реагентами на SH-группы. В силу своей высокой реакционной способности SH-группы участвуют во многих химических реакциях и выполняют важнейшие структурные и метаболические функции [6].

Высокие концентрации SH-групп присущи клеткам с высокой метаболической активностью и вполне естественно, что повышенное их содержание обнаруживается в клетках, активно синтезирующих РНК и белки [2]. На основании этого система ооцит—вспомогательные клетки может служить адекватной моделью для исследования количества и концентрации SH-групп, что и послужило основанием для проведения данной работы, тем более что работ по изучению этих групп в оогенезе животных в доступной нам литературе не обнаружено.

Процесс развития ооцита араратской кошенили—насекомого с политрофным строением овариол и нутриментарным типом оогенеза—подразделяется на два периода: дофолликулярный, в котором идет малый рост ооцита, и фолликулярный, во время которого происходит большой рост ооцита. Последний состоит из пяти стадий [5, 7].

В настоящем сообщении приводятся результаты цитофотометрического исследования концентрации и содержания белковых SH-групп в ооците, питающих и фолликулярных клеток араратской кошенили в течение фолликулярного периода развития.

Материал и методика. Работа проводилась в лаборатории цитологии и эмбриологии Института экспериментальной биологии АН АрмССР, осенью 1983, зимой, весной 1984 гг.

Яйчики личинок и половозрелых самок араратской кошенили извлекали в 0,75%-ном (изотоническом) растворе хлористого натрия, фиксировали в ФСУ (формалин—этанол—уксусная кислота, 9:3:1) и заливали в парафин. Реакцию на связанные с белком SH-группы проводили на парафиновых срезах (5 мкм). Срезы выдерживали в 0,05%-ном растворе 2,2-диокси-6,6-динафтил-дисульфида (ДДД) в течение 1 часа при температуре 55°, а затем докрашивали в 0,06%-ном растворе диазониевой соли прочного черного К в течение 8 минут. Фотометрию проводили на зондовом цитофотометре одноволновым методом (длина волны 555 нм). Содержание SH-групп на клетку вычисляли путем умножения значений оптической плотности (среднее из 3—5-ти измерений на клетку; 50—60 клеток на стадию) на величину площади клетки и выражали в условных сравниваемых единицах.

Результаты и обсуждение. Показано, что во всех типах клеток содержание SH-групп увеличивается (рис.), но если этот процесс в ооците и фолликулярных клетках продолжается до конца исследуемого периода, то в питающих клетках оно повышается до начала IV стадии, а затем постепенно уменьшается. Изменяется также концентрация этих групп, причем в ооплазме до начала III стадии она повышается, а затем падает ниже первоначального значения, после чего вновь повышается и выходит на плато. В трофоцитах этот показатель увеличивается до начала IV стадии, затем падает, а в фолликулярных клетках почти не меняется.

Объяснить эти изменения можно исходя из функций изученных клеток и при сравнении их с кинетикой содержания и концентрации общего белка [7]. У кошенили I и II стадии фолликулярного периода совпадают с процессом превителлогенеза, а III, IV и V стадии—с вителлогенезом. Масса суммарного белка, по нашим данным (рис.), в ооплазме и цитоплазме питающих клеток на начальных этапах развития ооцита увеличивается интенсивнее, чем их размеры, и концентрация белка увеличивается соответственно. При сравнении кривых, отражающих изменения содержания и концентрации суммарного белка и SH-групп, можно заметить, что они меняются в зависимости от тех же показателей белка. Увеличение содержания и концентрации SH-групп в ооците и трофоцитах на первых стадиях, по всей вероятности, связано с повышением их функциональной активности. В пользу такого вывода говорит особенно высокая функциональная активность этих клеток в превителлогенезе. Снижение же концентрации SH-групп в ооплазме с конца II—начала III стадии связано с резким падением концентрации суммарного белка. Известно, что в период вителлогенеза путем диффузии из гемолимфы происходит интенсивное насыщение ооплазмы низкомолекулярными соединениями [1]. Этим обстоятельством, а не понижением белковых синтезов в ооците объясняется снижение концентрации суммарного белка на единицу площади ооплазмы

при непрерывном увеличении содержания белка и площади ооцита [7].

Как уже было сказано, понижение концентрации SH-групп и белка в трофобlastах начинается с конца III стадии (рис.)—в вителлогенезе. Функция трофобlastов заключается в синтезе для ооцита рРНК и части

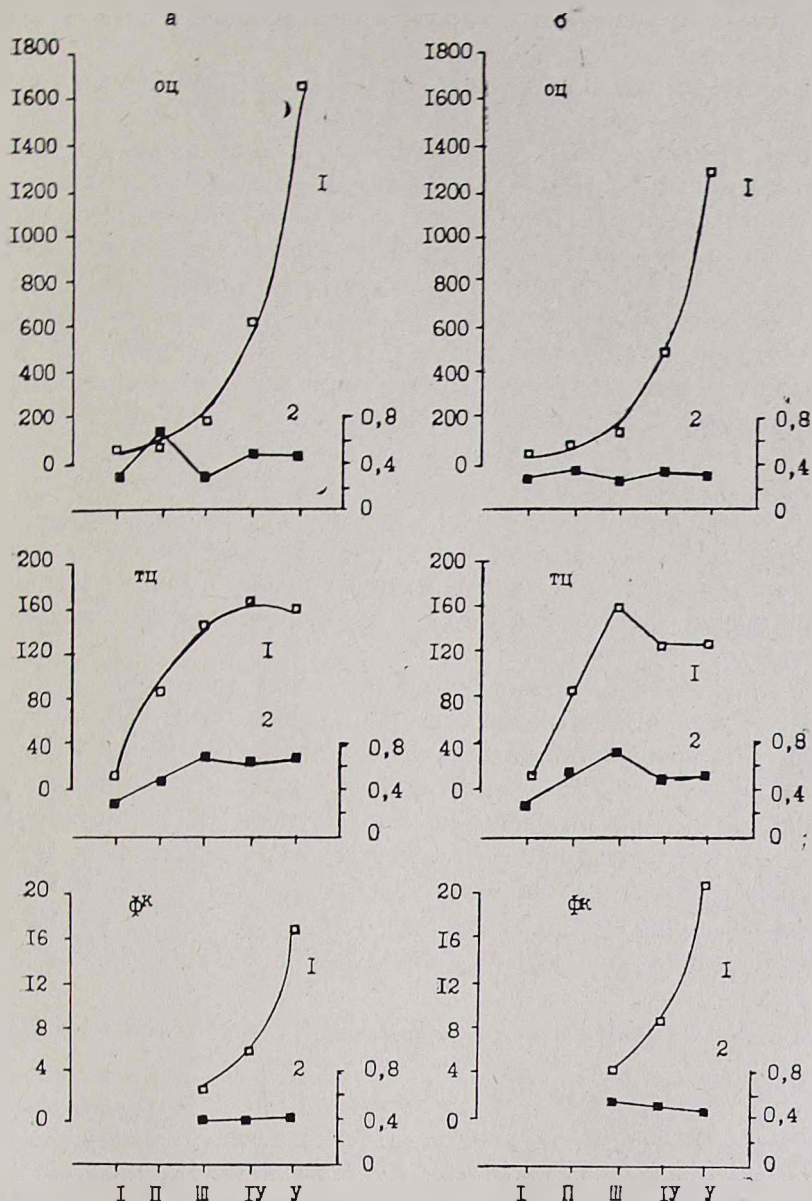


Рис. Динамика содержания (1) и концентрации (2) суммарного белка (а) и SH-групп (б) в цитоплазме ооцитов (оц), трофобlastов (тц) и фолликулярных клеток (фк) в овогенезе кошенили. По оси абсцисс—стадии развития фолликула; по оси ординат слева—содержание, справа—концентрация в усл. ед.

белков (в частности, белков рибосом) [1, 3]. Известно, что активно растущие и полиплоидизирующиеся в начале овогенеза трофобlastы в мезостематических яичниках насекомых в дальнейшем отстают в росте

от ооцита и дегенерируют до завершения или в самом начале вителлогенеза [14, 15]. У аракатской кошенили понижение концентрации и содержания сульфидрильных групп на первых этапах вителлогенеза может свидетельствовать о начале спада функциональной активности этих клеток. Действительно, с этого момента трофоциты, хоть и продолжают функционировать, но постепенно сморщиваются, уменьшаются в размерах и дегенерируют.

Несколько иная картина наблюдается в фолликулярных клетках. Эти клетки, окружая ооцит, служат клеточным барьером между ним и внешней средой. Их цитофотометрическое исследование становится возможным лишь с III стадии фолликулярного периода—вителлогенеза. Концентрация SH-групп в этих клетках за исследуемый период незначительно снижается, а их содержание неизменно растет. Фолликулярные клетки секретируют в ооплазму гликопротеиды на первых стадиях оогенеза. Их секреторная активность становится более повышенной в период образования хориона [1]. В последние 10—15 лет был опубликован ряд работ, авторы которых с той или иной степенью уверенности говорят об участии фолликулярных клеток в синтезе желточных белков [9—12]. Все это показывает, что фолликулярные клетки насекомых сохраняют высокую метаболическую активность на всем протяжении своего функционирования. У кошенили они тоже активно функционируют до завершающих этапов вителлогенеза и момента образования хориона. Об этом свидетельствуют сравнительная стабильность концентрации SH-групп и белка и постоянное накопление их в этих клетках.

Увеличение содержания SH-групп во всех трех типах клеток обусловлено увеличением количества суммарного белка. Данные, приведенные в таблице, показывают, что соотношение между суммарным белком и SH-группами за исследуемый период во всех клетках меняется (табл.). Самая низкая удельная концентрация УК (число выявленных SH-групп на единицу массы белка) в ооплазме приходится на II стадию, при сравнительно высокой общей концентрации SH-групп, а максимальная, при низкой общей концентрации,—на III стадию (рис.). Таким образом, УК SH-групп в ооците изменяется независимо от изме-

Таблица

Концентрация SH-групп и соотношение белок/SH-группы в цитоплазме ооцита и вспомогательных клеток

Стадии развития	Ооцит		Трофоциты		Фолликулярные клетки	
	концентрация	УК	концентрация	УК	концентрация	УК
I	0,29	1:0,81	0,29	1:0,81	—	—
II	0,34	1:0,52	0,59	1:1,05	—	—
III	0,27	1:0,87	0,76	1:0,07	0,59	1:1,42
IV	0,38	1:0,78	0,52	1:0,76	0,54	1:1,37
V	0,35	1:0,77	0,56	1:0,79	0,52	1:1,26

нений общей концентрации этих групп. Подобная картина может быть обусловлена двумя обстоятельствами.

Существует гипотеза о стерической недостаточности SH-групп, обусловленной третичной структурой белковой молекулы. Согласно этой гипотезе, пониженной реакционной способностью отличаются SH-группы, находящиеся внутри белковой глобулы, что хорошо согласуется с возрастанием реакционной способности этих групп при денатурации белка [6]. Эти изменения в УК SH-групп в соите независимо от их общей концентрации могут быть обусловлены также и качественными изменениями суммарного белка. По данным Вудланда и Адамсона [16], неоплодотворенная яйцеклетка амфибий содержит большой пул гистонов, не связанных с ДНК, а, как известно, из всех пяти хорошо изученных гистонов только молекула гистона H3 содержит всего один остаток цистеина. Кроме гистонов в растущей яйцеклетке могут синтезироваться и другие, не содержащие тиоловых групп белки, а также белки со сравнительно низким или высоким содержанием этих соединений.

В трофоцитах изменения УК SH-групп происходят в соответствии с изменениями их содержания и общей концентрации и отражают функциональное состояние этих клеток в ходе оогенеза.

Самая высокая УК SH-групп обнаружена в фолликулярных клетках. Этот факт интересен, особенно если учесть, что средняя концентрация SH-групп в них сравнительно невысока (табл.). Можно предположить, что в фолликулярных клетках пространственная конфигурация белковых молекул максимально благоприятна для выявления SH-групп, а суммарный белок состоит в основном из белков с высоким содержанием этих групп.

Институт экспериментальной биологии
АН Армянской ССР

Поступило 3.VIII 1984 г.

**ՍՊԻՏԱԿՈՆՑԵՆՏՈՒՄԻՆ ՏH-ԽՄԲԵՐԻ ԿՈՆՑԵՆՏՐԱՑԻԱՅԻ ԵՎ ՔԱՆԱԿԻ
ՑԻՏՈՑԻՆՈՍՄԵՏՐԻԿ ՌԵԱԿՏԻՎՆԵՍԻՏԵՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ ՕՕԳԵՆԵ
ԲՋԻՋՆԵՐԻ ՑԻՏՈՊԼԱԶՄԱՅՈՒՄ ԱՐԱՐԱՏՅԱՆ ՈՐԴԱՆ ԿԱՐՄԻ
ՕՕԳԵՆԵԶԻ ԸՆԹԱՑՔՈՒՄ**

Մ. Գ. ԽԱԶԱՏՐՅԱՆ

Արտրատյան որդան կարմրի օօգենեզի ընթացքում օօցիտում և օժանդակ բջիջներում սպիտակուցային SH-խմբերի կոնցենտրացիայի և քանակի ցիտոֆոտոմետրիկ ուսումնասիրությունը ցույց է տվել, որ այդ պարամետրերի դինամիկան օօգենեզի ընթացքում կախված է ընդհանուր սպիտակուցի կոնցենտրացիայի և քանակի փոփոխությունից ու այդ բջիջների ֆունկցիոնալ վիճակից: Ցույց է տրված, որ SH-խմբերի տեսակարար կոնցենտրացիան (S_4) (հայտնաբերված SH-խմբերի թիվը սպիտակուցի միավոր մասսայում) օօգենեզի ընթացքում օօցիտում և օժանդակ բջիջներում փոփոխվում է SH-խմբերի ընդհանուր կոնցենտրացիայից անկախ և կախված է սպիտակուցի մոլեկուլների տարածական կառուցվածքից և ընդհանուր սպիտակուցի որակական կազ-

միջ: Տրոֆոցիտներում այդ ցուցանիշը փոփոխվում է SH-խմբերի քանակին և կոնցենտրացիային համապատասխան, հետևաբար արտացոլում է տրոֆոցիտների ֆունկցիոնալ վիճակը: Ֆոլիկուլյար բջիջներում S4 փոփոխվում է SH-խմբերի ընդհանուր կոնցենտրացիայի փոփոխմանը զուգահեռ և, ինչպես օօցիտում, կախված է ընդհանուր սպիտակուցի որակական կազմից և սպիտակուցային մոլեկուլների տարածական կառուցվածքից:

CYTOPHOTOMETRIC INVESTIGATION OF CONTENTS AND CONCENTRATION OF PROTEIN SH-GROUPS IN THE OOCYTE AND AUXILIARY CELLS CYTOPLASM DURING ARARATIAN COCHINEAL OOGENESIS

M. G. KHACHATRIAN

Sulphydryl groups content and concentration in the oocyte and auxiliary cells of Araratian cochineal were determined using cytophotometric methods. These parameters are shown to depend on changes in the total protein content and concentration, as well as on the functional state of the cells. Sulphydryl groups content per mass unit of protein (partial concentration, PC) during oogenesis behaves differently in different types of cells. In the oocyte the PC variation does not correlate with the total SH-groups concentration and seems to depend on the type and conformation of proteins. In the trophocytes the PC correlates with SH-groups concentration and content and therefore seems to be related to functional state of these cells. In the follicular cells the PC varies in parallel with SH-groups concentration and, as in the case of oocyte, depends on the type and conformation of the protein molecules.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Айзенштадт Т. Б. Цитология оогенеза. М., 1984.
2. Бар Г. Ф. Введение в количественную цитохимию. М., 1969.
3. Грузова М. Н. Онтогенез, 13, 6, 563—571, 1982.
4. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М., 1966.
5. Магакян Ю. А., Макарян С. Р., Петросян А. В., Мкртчян Л. П., Аброян Л. О., Акопян Л. А. Цитология, 18, 8, 932—935, 1976.
6. Торчинский Ю. М. Сера в белках. М., 1977.
7. Хачатрян М. Г., Акопян Л. О., Петросян А. В., Каралова Е. М., Макарян С. Р., Магакян Ю. А. Цитология, 21, 4, 382—390, 1979.
8. Barron E. S. G. Texas Repts Biol. and Med., 11, 653—660, 1953.
9. Bitsch J. Intern. J. Insect. Morphol. and Embryol., 9, 25—49, 1980.
10. De Loof A. Zitschr, Zellforsch., 115, 351—360, 1971.
11. Huebner E., Tobe S. S., Davey K. G. Tissue and Cell, 7, 535—558, 1975.
12. Gutzeit H. O. W. Roux'Archives, 139, 221—224, 1980.
13. Klein P., Robbins E. J. Cell. Bioll., 46, 165—168, 1870.
14. Matsuzaki M. Japan. J. Entomol 43, 1, 75—90, 1975.
15. Urbani E. Monit. zool. ital., 3, 55—87, 1969.
16. Woodland H. K., Adamson E. D. Develop. Biol., 57, 118—135, 1977