

## КОНТАКТНАЯ СТИМУЛЯЦИЯ РАЗМНОЖЕНИЯ ГОМОЛОГИЧНЫХ КЛЕТОК В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Г.Г. ГАСПАРЯН\*, Р.М. ГРИГОРЯН\*, Н.К. САРКИСЯН†, А.В. САЯДЯН\*,  
Э.Ю. ДАБАГЯН\*\*, В.Т. МОВСЕСЯН\*\*

\*Институт зоологии НАН Армении, \*\*НИИ биотехнологии, 375014, Ереван

Исследовано описанное нами ранее явление контактной стимуляции клеточного размножения в культурах эмбриональных клеток крысы и человека. Показано, что добавление гомологичных клеток, живых или фиксированных, активирует пролиферацию клеток в сложившихся культурах. Предполагается, что регуляция размножения клеток путем их контактного взаимодействия относится к универсальным и консервативным в эволюционном отношении явлениям.

Ուսումնասիրվել է նախկինում մեր կողմից նկարագրված բջջային բազմացման կոնտակտային խթանման երևույթը առնետի և մարդու սաղմնային բջիջների կուլտուրայում: Բացահայտվել է, որ կենդանի կամ ֆիքսված հոմոլոգ բջիջների ավելացումը ակտիվացնում է բջիջների պրոլիֆերացիան ծևավորված կուլտուրայում: Ենթադրվում է, որ բջիջների բազմացման կարգավորումը կոնտակտային փոխազդեցության ճանապարհով վերաբերում է էվոլյուցիոն տեսակետից ունիվերսալ և կոնսերվատիվ երևույթներին:

The phenomenon of contact stimulation of cell proliferation described earlier was studied in cultures of rat and human embryo cells. Adding of living or fixed cells were shown to activate the cell growth in built-up cultures. It is proposed that the cell growth regulation mediated by cell contact interactions is one of universal and evolutionary conservative phenomena.

### *Культуры клеток млекопитающих - стимуляция размножения - межклеточные контакты*

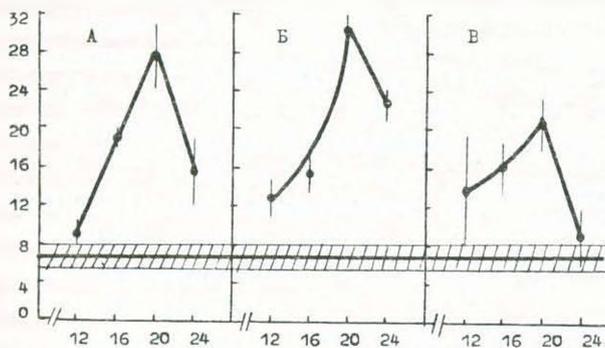
В исследованиях, выполненных на культуре клеток куриного эмбриона, нами было обнаружено не описанное ранее явление контактной стимуляции пролиферации гомологичных клеток. Было показано, что добавление живых или инактивированных гомологичных клеток ускоряет размножение клеток в субконфлуентных культурах [1], а в культурах низкой плотности способствует выживанию и формированию клеточных колоний [3, 10]. Была выявлена контактная природа митогенных взаимодействий между добавленными и резидентными клетками [9] и высказано предположение о возможном пути передачи митогенного сигнала от клетки к клетке при их непосредственном физическом контакте [2].

В то же время оставался без ответа вопрос о видоспецифичности обнаруженного феномена. Иначе говоря, было неясно, осуществляется ли он только в популяциях клеток птиц или же характерен также для клеток других организмов. Для ответа на поставленный вопрос мы проследили кинетику клеточной пролиферации в культурах эмбриональных клеток крысы и человека. Клетки содержали в тех же условиях, в которых осуществлялась контактная стимуляция клеточного размножения в культуре клеток куриного эмбриона [9].

**Материал и методика.** Первичную культуру клеток 18-19-дневных крысиных эмбрионов содержали в среде DMEM (Gibco) с 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Serva). Клетки пересеивали в пенициллиновые флаконы с кусочком покровного стекла на дне и в стеклянные культуральные матрасы в концентрации  $0,2 \times 10^6$  кл/мл. Через 4 сут после начала эксперимента (0 ч) в трети флаконов меняли старую питательную среду на свежую, в другую треть флаконов вносили по  $0,15 \times 10^6$  гомологичных живых клеток из матраса в минимальном объеме среды без сыворотки, а в оставшиеся флаконы добавляли такое же число клеток, фиксированных 96%-ным этанолом. Фиксацию проводили в течение 20 мин с последующей трехкратной отмывкой клеток средой, механическим соскабливанием их с субстрата и ресуспендированием в среде без сыворотки. Скорость клеточной пролиферации оценивали по включению радиоактивного  $^3\text{H}$ -тимидина в клетки, для чего начиная с 12 и до 24 ч каждые 4 ч культуры инкубировали с  $^3\text{H}$ -тимидином в конечной концентрации 0,2 мКи/мл. Покровные стекла с культурами фиксировали смесью этанол: уксусная кислота (3:1), покрывали ядерной эмульсией Ilford-L4 и готовили радиоавтографические препараты по общепринятой методике [5]. Подсчитывали индекс меченых клеток в процентах из 1000 клеток в 4-5 культурах на каждый срок.

Клетки эмбриона человека штамма М-22 (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов МЗ РФ, Москва) на 20-м пассаже культивировали в среде ВМЕ (Sigma) с 10% бычьей сыворотки в пластиковых культуральных платах (Linbro) с кусочком покровного стекла на дне либо в матрасах. Клетки высевали в концентрации  $0,1 \times 10^6$  кл/мл (по 2 мл на лунку) и культивировали 3 суток. К этому времени (0 ч) в часть лунок дополнительно вносили по  $0,2 \times 10^6$  гомологичных клеток. С 12 по 36 ч каждые 4 ч повторно инокулированные и интактные (контроль) культуры инкубировали с  $^3\text{H}$ -тимидином. Остальные процедуры были аналогичны описанным выше.

**Результаты и обсуждение.** В культуре клеток крысиного эмбриона смена питательной среды стимулировала размножение клеток (рис.1 А). Такое же действие оказывало добавление живых (рис.1 Б) и фиксированных этанолом (рис.1 В) клеток. Различия между значениями индекса меченых клеток в интактной культуре и в стимулированных культурах через 20 ч были достоверными во всех вариантах опыта ( $p < 0,05$ ). Кинетика стимулированной клеточной пролиферации не зависела от способа митогенного воздействия: во всех случаях возрастание числа ДНК-синтезирующих клеток начиналось с 16 ч и достигало максимума к 20 ч, после чего индекс меченых клеток снижался. Такая хронология событий, судя по литературным данным, характерна для стимуляции синтеза ДНК в культурах фибробластоподобных клеток крысы (см., напр., [14])



**Рис. 1.** Скорость клеточной пролиферации в культуре клеток эмбриона крысы после смены питательной среды (А), добавления живых (Б) и фиксированных этанолом (В) клеток.

По оси абсцисс - время после начала эксперимента ч, по оси ординат - индекс меченых клеток, %.

В интактной культуре клеток М-22 за время наблюдений происходило постепенное уменьшение пролиферативной активности клеток (рис.2), что свидетельствует о переходе культуры из логарифмической в стационарную фазу роста. Добавление экзогенных гомологичных клеток временно ускоряло

клеточное размножение: число меченых клеток возрастало с 12 до 28 ч, а затем снижалось. Известно, что длительность пререпликативного периода (временной интервал от начала стимуляции до увеличения числа ДНК-синтезирующих клеток) в культуре клеток эмбриона человека составляет 10-12 ч, а пик стимулированного синтеза ДНК приходится на 22-26 ч [4, 8], что близко к полученным результатам.

Отметим, что в последнем опыте, как и в одном из вариантов описанного выше эксперимента (рис.1 Б), ускорение роста клеток происходило одновременно с повышением плотности клеточной популяции, так как известно, что значительная часть добавляемых к сформированной культуре живых клеток прикрепляется к свободному субстрату и поверхности резидентных клеток [7, 9].

Изложенные результаты говорят о том, что инокуляция гомологичных клеток, как живых, так и фиксированных этанолом, в сформированные культуры клеток млекопитающих (крысы и человека) стимулирует клеточную пролиферацию.

Согласно широко распространенным представлениям, гуморальные (растворимые) продукты клеточного метаболизма могут быть как стимуляторами, так и ингибиторами размножения клеток, тогда как за межклеточными контактами признается роль только негативного регулятора, блокирующего клеточную пролиферацию [11]. Следует отметить, что недавние исследования, выявившие феномен так называемой юкстакринной (juxtacrine) стимуляции роста клеток [6] и сигнально-рецепторные свойства молекул межклеточной адгезии [16], не поддерживают последнее утверждение и свидетельствуют о возможности эффективной передачи от клетки к клетке митогенных сигналов посредством нерастворимых молекул, иммобилизованных на клеточной поверхности. О том же говорят результаты цитированных выше наших работ - прямое свидетельство ростстимулирующих контактных взаимодействий между соседними клетками.

Итак, показано, что контактная стимуляция размножения гомологичных клеток не является видоспецифичным феноменом, она осуществляется в культурах клеток не только птиц, но и млекопитающих.

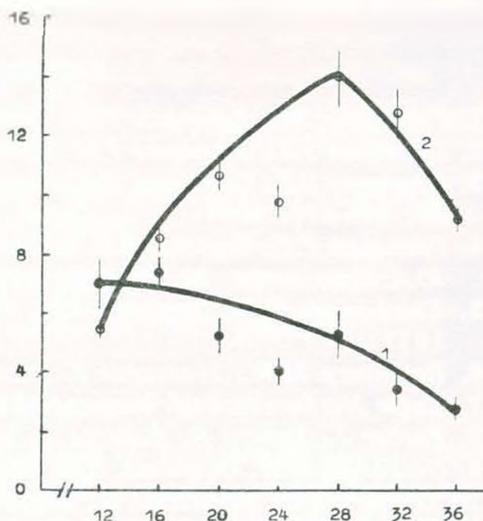


Рис.2. Скорость клеточной пролиферации в интактной культуре клеток эмбриона человека (кр.1) и после добавления в культуру гомологичных клеток (кр.2).

Обозначения по осям те же, что на рис.1.

Возможно, что механизм ускорения роста клеток с участием межклеточных контактных взаимодействий относится к таким универсальным и консервативным в эволюционном отношении явлениям, как известные пути межклеточной коммуникации [12] и сигнальные системы контроля клеточной пролиферации [13], выживания и гибели клеток [15]. Дальнейшие исследования с использованием широкого круга биологических объектов позволят проверить высказанное предположение.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гаспарян Г.Г., Григорян Р.М. Цитология, 31, 97-600, 1990.
2. Гаспарян Г.Г., Григорян Р.М. Цитология, 35, 65-69, 1993.
3. Гаспарян Г.Г., Саркисян Н.К., Саядян А.В., Григорян Р.М. Цитология, 39, 566-570, 1997.
4. Гаспарян Г.Г., Терских В.В., Зосимовская А.М., Закарян Г.Г., Магакян Ю.А. Цитология, 22, 684-688, 1980.
5. Епифанова О.И., Терских В.В., Захаров А.Ф. Радиоавтография. М., 1977.
6. Rosenberg M.W., Massague J. Curr.Opin.Cell Biol., 5, 832-838, 1993.
7. Eagle H., Levine E.M. Nature, 123, 1102-1106, 1967.
8. Farber J., Rovera S., Baserga R. Biochem.J., 122, 189-195, 1971.
9. Gasparian G.H., Grigorian R.M. Acta Biol.Hung., 41, 373-385, 1990.
10. Gasparian G., Sarkissian N., Sayadian A., Grigorian R. Cell Biol.Int., 22, 51-53, 1998.
11. Gradl G., Faust D., Oesch F., Wieser R.J. Curr.Biol., 5, 526-535, 1995.
12. Le Roith D., Shiloach J., Berelowitz M., Frohman L.A., Liotta A.S. Krieger D.T., Roth J. Fed.Proc., 42, 2602-2607, 1983.
13. Nurse P. Nature, 344, 503-508, 1990.
14. Okuda A., Kimura G. J. Cell Physiol., 110, 267-270, 1982.
15. Raff M.S. Nature., 356, 397-400, 1992.
16. Ruoslahti E., Obrink B. Exper.Cell Res., 227, 1-11, 1997.

Поступила 13.II.1998