

А. В. АЛЕСЕНКО, Е. Б. БУРЛАКОВА, А. А. ВАЙНСОН

ИЗМЕНЕНИЕ АНТИОКИСЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЛИПИДОВ ПО СТАДИЯМ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК HeLa

(Представлено академиком Г. М. Франком 22 III 1971)

Изучение антиокислительной активности липидов (а.о.а.) было предпринято в связи с тем, что эта физико-химическая величина в определенной мере отражает уровень внутриклеточных окислительно-восстановительных и свободнорадикальных реакций, знание которых необходимо для понимания характера клеточного метаболизма (¹, ²).

В работе (³) было высказано предположение о том, что в липидных компонентах клетки могут развиваться окислительные свободнорадикальные реакции, в ходе которых образуются вещества, тормозящие клеточное размножение. Природные антиоксиданты, например фосфолипиды, могут ингибировать эти свободнорадикальные реакции, регулируя тем самым их интенсивность и опосредованно — продвижение клеток по стадиям клеточного цикла.

Поскольку антиокислительная активность в основном определяется уровнем природных антиоксидантов, то ее величина может отражать уровень клеточной пролиферации.

В ряде работ ранее было показано, что при интенсивном размножении клеток (росте злокачественных новообразований, восстановлении печени после частичной гепатэктомии и т. д.) происходит повышение антиокислительной активности липидов (⁴, ⁵), при снижении клеточной пролиферации (лучевой болезни, действии стрессорных агентов, угнетении клеточного деления цитостатиками) ослабевают антиокислительные свойства липидной вытяжки (⁶, ⁷). Была обнаружена связь между суточным ритмом митозов и суточными колебаниями антиокислительной активности липидов (⁸). Изменение антиокислительной активности с помощью препаратов из класса ингибиторов свободнорадикальных процессов вызывает направленные изменения в ходе развития злокачественных новообразований, лучевой болезни и скорости восстановления печени после частичной ее резекции (⁹, ⁹).

Подобные результаты дали возможность предположить, что антиокислительная активность липидов является величиной существенной для деятельности клетки. Поэтому было интересно установить, каким образом происходит ее изменение по стадиям клеточного цикла.

В работе использовали клетки HeLa, выращиваемые в монослое на среде, состоящей из 40% среды 199, 40% среды Игла и 20% сыворотки крупного рогатого скота.

Для биохимических опытов клетки рассеивали в матрасы по 10 млн клеток в 100 мл среды, инкубирование проводили в термостате с подачей 5% CO₂.

Митотический цикл данной линии клеток был определен ранее по кривой меченых митозов и по накоплению меченых клеток при непрерывном росте культуры в среде с H³-тимидином (¹⁰). Общая продолжительность периодов G₁, S и G₂ составляла соответственно 9, 11 и 7 час.

Для биохимических опытов, требующих больших количеств материала, наиболее приемлемой является синхронизация с помощью метаболических

ингибиторов. Мы использовали накопление клеток в S-периоде блокированием синтеза ДНК аметоптерином или избыточной концентрацией тимидина. Аметоптерин в концентрации 10^{-6} мол/л или тимидин в концентрации $4-6 \cdot 10^{-3}$ мол/л добавляли на 24 часа через двое суток после посева культуры. Блок в первом случае снимали отмыванием аметоптерина средой с 10 мкг/мл тимидина, а во втором случае — отмыванием тимидина чистой средой.

Для опытов по изучению режима синхронизации клетки выращивали на покровных стеклах в пенициллиновых флаконах, процент клеток в S-периоде определяли автордиографически.

Через 3—6 час. после снятия блока число клеток в S-периоде достигает 85—90% (рис. 1а).

Для получения клеток в периодах G_1 и G_2 была использована синхронизация клеток двойным блоком синтеза ДНК. В этих опытах лучшие результаты были получены при использовании тимидина. На рис. 1б представлена кривая накопления меченых клеток после снятия второго тимидинового блока синтеза ДНК. Через 16 час. после снятия первого блока процент меченых клеток в стадии синтеза ДНК снижался до 10%, и после введения в этот момент тимидина еще на 24 часа вторая волна клеток в S-периоде достигала 95%, а, главное, впоследствии снижалась до 3,5%. Пик волны митозов приходился на 10 час. после снятия второго блока (пунктирная кривая рис. 1). Можно считать, что в интервале времени 6—8 час. основная масса клеток находится в стадии G_2 , а между 16—18 час. — в стадии G_1 после снятия второго блока.

Монослой клеточной культуры снимали со стеклянной подложки с помощью трипсина. Снятые клетки центрифугировали и промывали трижды охлажденным до 5° физиологическим раствором. Все работы проводились на холоду. Поскольку из полученного клеточного материала липиды тотчас же не извлекали, то его хранили в сосуде Дьюара с сухим льдом. Перед извлечением липидов клетки лиофилизировали и в сухом состоянии взвешивали. Липиды извлекали смесью хлороформ — метанол (2:1) из клеточной массы, полученной в результате объединения двух-трех партий синхронизированных клеток по определенной фазе клеточного цикла.

Количество общих липидов по стадиям клеточного цикла (% к сухому весу клеток) представлено ниже:

Фаза	G_1	S	G_2
Аметоптерин	14,8	10,6	14,7
Тимидин	12,7	7,9	12,4

Наблюдается некоторое уменьшение общих липидов в фазе S. Полученные липидные вытяжки использовались для определения их антиокислительных свойств.

Моделью для определения антиокислительной активности липидов служило термическое окисление метилового эфира олеиновой кислоты при 36° (11).

При изучении нами изменений антиокислительной активности липидных вытяжек, извлеченных из клеток, находящихся в G_1 -, S- и G_2 -фазах цикла, полученных двумя типами синхронизации, обнаружено, что характер изменений антиокислительной активности не зависит от типа синхронизации.

На рис. 2 схематически представлены значения антиокислительной активности липидов на разных стадиях клеточного цикла при синхронизации аметоптерином (рис. 2, 1) и тимидином (рис. 2, 2).

Значение а.о.а. липидов, извлеченных из клеток в стадии G_1 , синхронизированных аметоптерином, равно 2500, а тимидином 1500 час·мл/г.

Липидная вытяжка, полученная из клеток в S-стадии, ускоряет окисление метилолеата, и значения ее а.о.а. оказались отрицательными.

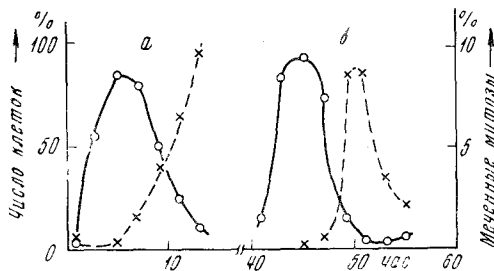


Рис. 1

Рис. 1. Кривая накопления меченых клеток после снятия первого (а) и второго (б) тимидинового блока синтеза ДНК. Пик волны митозов обозначен пунктирной кривой

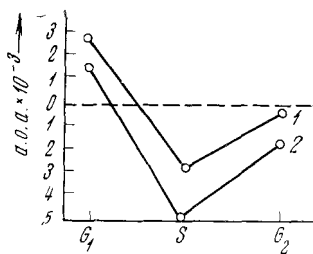


Рис. 2

Рис. 2. Антиокислительная активность липидов на разных стадиях клеточного цикла при синхронизации аметоптерином (1) и тимидином (2)

В G_2 -периоде антиокислительная активность липидов вновь нарастает, доходя до нулевого значения (рис. 2, 1) или до значения равного —1500 час. · мл/г (рис. 2, 2).

Таким образом, липиды из клеток, проходящих G_1 -фазу, обладают наибольшим антиокислительным действием.

Как можно объяснить значение антиокислительной активности для клеточной пролиферации? Известно, что липиды играют важную роль как структурные элементы клеточных мембран. Физико-химические свойства липидов могут изменять физико-химические свойства мембраны в целом и в определенной степени влиять на скорость синтетических процессов, происходящих на мембране. Поскольку антиокислительная активность является отражением именно физико-химических свойств липидных компонентов, то ее изменение может быть связано с теми процессами в клетке, которые происходят на мембранных структурах.

В частности, в настоящее время предполагают, что для репликации ДНК необходимо образование комплекса нуклеопротеида с липопротеидами мембран так называемого ДНК-гистоно-липопротеидного комплекса (12). Возможно, что изменение антиокислительной активности липидов и скорость этого процесса являются взаимосвязанными. Нами получены данные о том, что в фазе синтеза ДНК значения антиокислительной активности являются отрицательными, т. е. в этой фазе клеточного цикла наиболее благоприятными являются условия радикалообразования в липидах, и это, в свою очередь, может сказаться на скорости образования и прочности этого комплекса.

Не исключено, что определенный интерес может представлять изменение антиокислительной активности липидов ядерной мембраны клеток во время синтеза ДНК. Результаты экспериментов по определению антиокислительной активности липидов из ядер синхронных клеток будут сообщены позднее.

Институт химической физики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
22 III 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. М. Эмануэль, Л. П. Липчина, ДАН, 121, 141 (1958). ² А. А. Вагбер, К. М. Wilbur, Radiation Res., 10, 167 (1959). ³ Е. Б. Бурлакова, В сборн. Физико-химические основы авторегуляции в клетках, «Наука», 1968, стр. 15. ⁴ Е. Б. Бурлакова, Н. П. Пальмина, Биофизика, 11, 2, 258 (1966). ⁵ Е. Б. Бурлакова, Н. П. Пальмина, Н. Н. Дрожинская, Биофизика, Изв. АН СССР, сер. биол., № 1, 134 (1971). ⁶ Е. Б. Бурлакова, Н. М. Дзюба и др., ДАН, 163, № 5, 278 (1965). ⁷ А. В. Алесенко, Е. Б. Бурлакова и др., Радиобиология, 6, № 5, 718 (1966). ⁸ А. В. Алесенко, Е. Б. Бурлакова, Н. И. Дубинская, Биофизика, 16, № 3 (1971). ⁹ Бурлакова, Н. М. Дзюба, Н. П. Пальмина, Биофизика, 10, 5, 706 (1965). ¹⁰ А. А. Вайнсон, А. М. Кузин, ДАН, 165, № 4, 933 (1965). ¹¹ А. В. Алесенко, Е. Б. Бурлакова, Н. М. Дзюба, Биофизика, 12, № 4, 735 (1967). ¹² V. Jackson, J. Earnhardt, R. Chalkley, Biochem. and Biophys. Res. Commun., 33, № 2, 258 (1968).