

А. Н. РУДЕНКО, С. В. КОНЕВ

О ФЕНОМЕНЕ САМОЗАЩИТЫ КЛЕТОК ОТ ТЕПЛОВОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 30 V 1972)

Известно влияние межклеточных взаимодействий на функциональное состояние животных клеток в культуре (¹⁻³). Предполагается, что межклеточные контакты являются решающим фактором при переходе культур микроорганизмов от логарифмической фазы развития к стационарной (³). Концентрация дрожжевых клеток влияет на темновую реактивацию после у.-ф. облучения (⁴), однако в доступной нам литературе мы не нашли указаний на роль концентрационного фактора в термической инактивации дрожжей (⁵).

В настоящей работе изучалось влияние концентрации дрожжевых клеток в водных суспензиях на их температурную устойчивость. В работе использовались несинхронизированные культуры дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Candida utilis*. Дрожжевые клетки выращивались на пивном сусле, разбавленном водопроводной водой (1:1) при постоянном встряхивании (температура 29°). В опытах использовались клетки культуры, не достигшей стационарной фазы развития (поздняя логарифмическая фаза).

Клетки отделялись от питательной среды центрифугированием, трижды промывались дистиллированной водой и концентрировались в дистиллированной воде до $5 \cdot 10^7$ кл/мл. Различные концентрации клеток создавались разведением густой суспензии дистиллированной водой. Тестом на температурное повреждение мембран и клеток служило дифференциальное окрашивание Понсо красным + уранил-пикратом, основанное на способности красителя проникать в клетки с нарушенным барьером проницаемости (⁶). Перед окрашиванием пробы подвергались действию повышенных температур в течение 5 мин., не включая стадию предварительного разогрева. При изучении влияния различных экзогенных веществ на термоустойчивость клеток время предварительного разогревания максимально сокращалось путем внесения в заранее нагретый до нужной температуры раствор очень малого по объему количества густой дрожжевой суспензии (1–2 капли в 20–25 мл). После пятиминутного нагревания пробирки с исследуемыми суспензиями быстро перемещались в ледяную воду и охлаждались там 5–10 мин. Затем суспензии центрифугировались, промывались охлажденной дистиллированной водой и окрашивались. Наблюдение и фотографирование проводилось на микроскопе МЛ-2 через зеленый светофильтр в видимом проходящем свете, в каждом образце (кадре негатива) подсчитывалось по 200 клеток.

Из рис. 1 видно, что термоустойчивость клеток увеличивается при повышении их концентрации в суспензии: температурное воздействие, повреждающее мембраны всех клеток в суспензиях низкой плотности, оказывается неэффективным по отношению к густым суспензиям.

Явление концентрационной самозащиты дрожжевых организмов выявляется не только методом окрашивания, но и методом подсчета макроколоний, образующихся после посева обработанных высокими температурами клеток на твердую питательную среду. После прогревания густой суспензии ($C = 5 \cdot 10^8$ кл/мл, 50°) оставалось 32% клеток, способных образовать

вать колонии, в то время как в разведенной суспензии ($C = 5 \cdot 10^2$ кл/мл) инактивировали все клетки.

Очевидно, можно представить себе два основных механизма межклеточных взаимодействий в концентрированных суспензиях, приводящих к взаимозащите от теплового повреждения: стабилизация мембран межклеточными контактами и выброс из клеток протектирующих веществ. Если справедлив второй механизм, то следовало ожидать существования протектирующей активности супернатантов, полученных от концентрированных культур, подвергнутых нагреванию.

Действительно, как видно из рис. 1 (кривая 2), подобный супернатант способен оказывать такое же защитное действие, как и высокая концен-

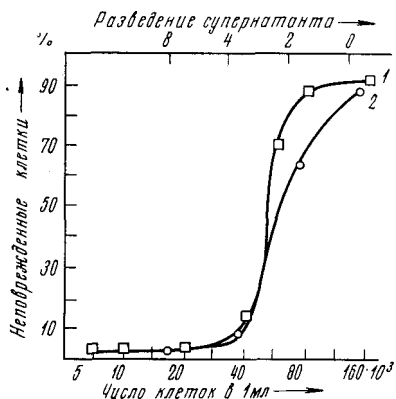


Рис. 1. Зависимость степени повреждения дрожжевых клеток от их концентрации (1) и от разведения супернатанта, полученного после нагревания плотной дрожжевой суспензии ($C = 150$ кл/мл) (2)

Об этом свидетельствует также и тот факт, что протективными свойствами обладает и жидкость, полученная выпариванием большого объема раствора, в котором прогревалась суспензия низкой концентрации. В обоих случаях жидкость, достаточно эффективно повышающая термоустойчивость дрожжевых клеток, может быть получена из таких суспензий, концентрация клеток в которых в 3–4 раза меньше, чем это необходимо для феномена самозащиты. Следовательно, самозащита клеток от нагревания осуществляется по химическому (выброс защитных веществ), а не по контактному механизму.

Возникает вопрос, представляет ли собой выброс протективных веществ температурно-независимый, спонтанный процесс, или для его индукции необходимо воздействие повышенными температурами. Специальные опыты показали, что супернатант, полученный после встряхивания концентрированной дрожжевой суспензии при комнатной температуре в течение 1 часа, защитными свойствами не обладал. В то же время нагревание такой суспензии уже до температуры 48–50°, при которой дрожжевые клетки даже в разбавленных суспензиях еще не повреждаются, приводит к выбросу защищающих веществ. Хотя при полном повреждении клеточной популяции при 60° образуется большее количество вещества-термопротектора, гибель клеток для его выделения все же не обязательна. Так, относительное число (доля) погибших (окрашенных) клеток было одинаковым как для суспензии, не подвергавшейся действию повышенной температуры (фон), так и для прогретой суспензии в условиях выраженной самозащиты (нагревание до температуры, при которой гибнут все клетки в низкой концентрации). Иными словами, клетки еще не погибли, но уже успе-

трация клеток. Оказалось далее, что дрожжевые клетки выделяют защищающий агент при нагревании их в любой, а не только в высокой концентрации. Так, жидкость, повышающая термоустойчивость клеток, может быть получена путем многократного поочередного прогревания суспензий низкой концентрации в одной и той же порции дистиллированной воды по схеме: прогрев — получение супернатанта — помещение в него новой порции клеток — второй прогрев — получение супернатанта — помещение в него новой порции клеток — третий прогрев и т. д. Оказалось, что после многократного повторения операции супернатант постепенно приобретает защитные свойства. Очевидно, в растворе происходит поэтапное накопление какого-то продукта, который приобретает протективные свойства по достижении определенной концентрации.

ли выделить защитное вещество. Об этом же свидетельствует и рис. 2, на котором сопоставлено число поврежденных клеток с количеством выпущенных из них свободных нуклеотидов при воздействии одного и того же температурного «удара», осуществляемого на фоне различных концентраций протектора. Видно, что между двумя различными суспензиями (первая — ненагревшаяся, вторая — подвергнутая нагреванию в оптимальной концентрации протектора), но содержащими одни и те же клетки, существуют значительные различия в количестве выпущенных нуклеотидов.

Следовательно, гибель клетки и выделение протективных веществ не связаны друг с другом жесткой причинной связью: при температурах, зна-

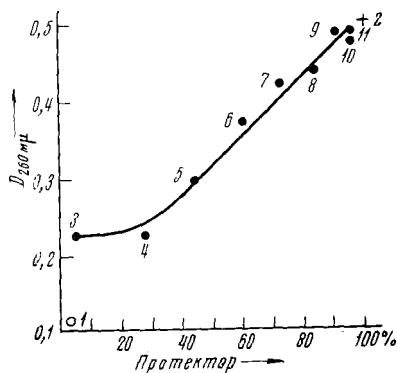


Рис. 2

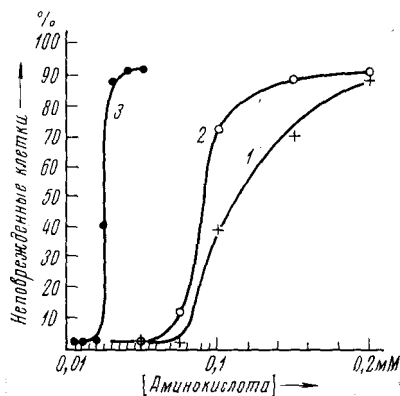


Рис. 3

Рис. 2. Зависимость выхода свободных нуклеотидов (экстинкция супернатанта при 260 мμ) и процента поврежденных (окрашенных) клеток (*Sacch. cerevisiae*) от нагревания (при 62°) в различных концентрациях протектора. 1 — контроль, не подвергавшийся нагреванию; 2 — нагревание в чистой дистиллированной воде; 3—11 — в протекторе: 4 мМ (3), 3,5 мМ (4), 2,0 мМ (5), 1,5 мМ (6), 1,0 мМ (7), 0,75 мМ (8), 0,5 мМ (9), 0,25 мМ (10), 0,1 мМ (11)

Рис. 3. Зависимость неповрежденных клеток от концентрации аминокислоты. 1 — глицин, 2 — DL-α-норлейцин, 3 — DL-β-фенил-α-аланин, L-триптофан, D-триптофан (*Candida utilis*, температура нагревания 60°)

чительно более низких, чем те, которые вызывают деструктивные повреждения цитоплазматических мембран (снятие барьеров проницаемости для красителя) и гибель клетки, происходит эффективный выброс протективных веществ при одновременном облегчении выхода внутриклеточных свободных нуклеотидов. Можно думать поэтому, что денатурационному, необратимому и губительному для клетки повреждению мембран предшествуют менее грубые функционально-структурные перестройки, происходящие при более низких температурах, в результате которых создаются условия для выброса протективного вещества. Возможность подобных перестроек мембран различного происхождения (в том числе и дрожжевых клеток (1)) при физиологически умеренных температурах показана в ряде работ (1, 7, 8).

Перейдем теперь к вопросу о химической природе протективного вещества. Прежде всего, опыты указывают на его термостабильность: супернатант прокипяченной суспензии дрожжевых клеток обладал таким же защитным действием, как и суспензия, нагретой до более умеренных температур. Это свидетельствует против самого по себе маловероятного предположения о том, что протектором являются термолабильные биополимеры — белки или нуклеиновые кислоты.

В дальнейших опытах был последовательно испытан ряд веществ, которые могли, предположительно, выделяться клетками при тепловом воздействии. Прежде всего было обнаружено, что 0,5% раствор сухого дрожжевого экстракта также способен оказывать четкое термозащитное

действие. Однако моно- и дисахара, фосфосахара, жирные кислоты, нуклеотиды в самых различных концентрациях (от 0,1% до 5% растворов) были неэффективными. После того как удалось установить, что 0,5% раствор гидролизата лактальбумина оказывает такое же защитное действие, как и 0,5% раствор сухого дрожжевого экстракта, возникло предположение, что эффект концентрационного повышения термоустойчивости дрожжевых клеток при нагревании определяют аминокислоты. Изучение протективной активности 10 мМ растворов различных аминокислот по отношению к температуре, на 4° превосходящей ту, которая необходима для повреждения клеток суспензии низкой концентрации в дистиллированной воде, показало, что не все они эффективны. Термопротекторами были только аминокислоты, у которых боковая цепь не имеет заряда (неполярные или гидрофобные аминокислоты). Аминокислоты с дополнительным зарядом (положительные или отрицательный) на боковой цепи защитными свойствами не обладали. Из рис. 3 видно, что неполярные аминокислоты оказывают термозащитное действие в низких концентрациях и в очень узком их интервале, причем ароматические и гетероциклические (триптофан) эффективнее алифатических.

В связи с этим представляется наиболее вероятным, что именно аминокислоты являются химическим протектором, ответственным за явление самозащиты. Поскольку методом прокрашивания регистрируется прежде всего структурное состояние цитоплазматических мембран (их проницаемость для красителя) и учитывая то обстоятельство, что термическое повреждение клеток инициируется прежде всего от мембран (1), представляется вполне вероятным, что аминокислоты играют роль структурных, а вовсе не метаболитических стабилизаторов мембраны.

Резюмируя все вышеизложенное, можно представить себе, по-видимому, следующую цепь событий, приводящих к концентрационному автопротективному эффекту: постепенное нагревание → функционально-структурная перестройка мембран → выделение из клеток протектора (аминокислот) → стабилизация ими мембран → повышение резистентности клеток к температуре. Очевидно, что в суспензиях низкой плотности концентрация выделяющегося протектора недостаточна для стабилизации мембран и повышения терморезистентности.

Лаборатория биофизики и изотопов
Академии наук БССР
Минск

Поступило
17 IV 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ С. В. Конев, С. Л. Аксенцев, Е. А. Черпицкий, Кооперативные переходы белков в клетке, Минск, 1970. ² Ю. И. Васильев, А. Г. Малепков, Клеточная поверхность и реакция клетки, М., 1968. ³ С. В. Конев, Ж. В. Прокопова, Докл. АН БССР, 16, 2 (1972). ⁴ E.-R. Lochmann, C. Umlauf, Stud. Biophys., 27, 2 (1971). ⁵ Уайт Джон, Технология дрожжей, М., 1957. ⁶ M. Maas, J. van Steveninck, Experimentia, 23, 3 (1967). ⁷ С. В. Конев, Е. А. Черпицкий др., Докл. АН БССР, 14, 66 (1970). ⁸ G. A. Blondin, W. J. Vail, D. E. Green, Arch. Biochem. and Biophys., 129, 156 (1969).