

В. А. КОЛЕСНИКОВ, А. А. КУЩ, А. В. ЗЕЛЕНИН

РАННИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СВОЙСТВ ДНП КЛЕТОК ПЕЧЕНИ ПОСЛЕ ЧАСТИЧНОЙ ГЕПАТЭКТОМИИ

(Представлено академиком В. А. Энгельгардтом 3 V 1973)

Применение комплекса цитохимических методов, разработанных для изучения свойств дезоксирибонуклеопротеида в целых клетках ⁽¹⁾, позволило получить ряд существенных фактов, касающихся ранних изменений свойств ДНП, развивающихся под влиянием стимула к пролиферации. Было показано (обзор ⁽²⁾), что при этом возрастает связывание с ДНП основного красителя акридинового оранжевого (АО), увеличивается чувствительность ДНП к тепловой денатурации и к кислотному гидролизу в реакции Фельгена. Изменения обратного характера обнаружены в тех случаях, когда пролиферирующие клетки прекращают размножаться ⁽²⁾.

До настоящего времени с помощью указанных методов были исследованы изменения свойств ДНП в лимфоцитах, стимулированных к пролиферации фитогемагглютинином ⁽³⁾ или за счет эффекта плотности ⁽⁴⁾, в ядерных эритроцитах ⁽⁵⁾ и спермиях в гетерокарионах ⁽⁶⁾.

Изученные клетки характеризовались тем, что их геном в исходном состоянии не функционирует или почти не функционирует. Представляло интерес выяснить характер изменений свойств ДНП при переключении к пролиферации клеток с активно функционирующим геномом. В качестве объекта для проведения такого исследования была выбрана регенерирующая печень. Как известно, гепатоциты взрослого животного, практически не пролиферируя, синтезируют значительное количество РНК и белка.

Опыты проводили на половозрелых морских свинках (вес 195—230 г), печень которых состоит в основном из клеток с диплоидными ядрами ⁽⁷⁾. Удаляли ²/₃ печени и использовали эту часть для приготовления контрольных отпечатков. Через определенные сроки после операции извлекали оставшуюся часть печени и готовили опытные препараты. Отпечатки делали на покровных стеклах равной толщины и, не подсушивая, фиксировали 30 мин. в смеси спирт — ацетон (1:1). Дальнейшую обработку препаратов проводили по методу Риглера ⁽¹⁾ с небольшими изменениями, описанными ранее ^(4, 6) и заключавшимися в том, что для отмывки препаратов от избытка АО использовали буферный раствор, содержащий этот краситель в низкой концентрации ($2 \cdot 10^{-8}$ М). Это изменение было внесено в методику с целью стандартизации условий удаления несвязавшегося АО. В большей части опытов окраску АО проводили, минуя процедуру ацетилирования. Сразу после приготовления препараты флуориметрировали на микроспектрофлуориметре, изготовленном ⁽⁶⁾ по стандартной схеме. О количестве АО, связавшегося с ядром, судили по интенсивности зе-

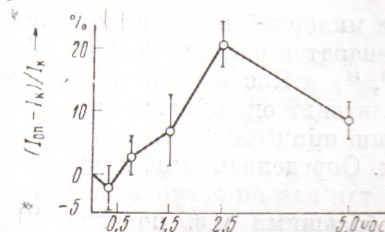


Рис. 1. Динамика связывания АО с ДНП клеток печени в различные сроки после гепатэктомии. $I_к$ — интенсивность флуоресценции до операции, $I_{оп}$ — то же, после операции

Рис. 1. Динамика связывания АО с ДНП клеток печени в различные сроки после гепатэктомии. $I_к$ — интенсивность флуоресценции до операции, $I_{оп}$ — то же, после операции

ленной люминесценции (I_{530}), выраженной в условных единицах. Чувствительность ДНП к тепловой денатурации изучали по методу, предложенному Риглером и др. (⁸, ⁹). При этом методе подвергнутый тепловому воздействию ДНП фиксируется в денатурированном состоянии формальдегидом и окрашивается АО по методике, описанной выше. Измеряется раздельно интенсивность флуоресценции красителя в мономерной (I_{530}) и димерной (I_{615}) форме, отражающей связывание АО соответственно с одно-

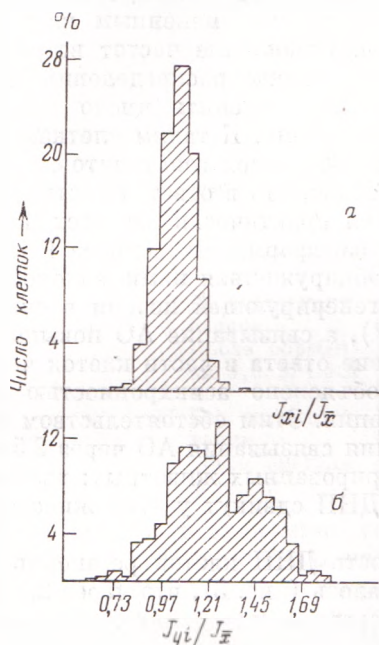


Рис. 2

Рис. 2. Гистограммы интенсивности флуоресценции ядер интактной печени до $-I_{xi}$ (а) и через 2,5 часа $-I_{yi}$ (б) после гепатэктомии. I_x — средняя интенсивность флуоресценции ядер до операции в каждом опыте

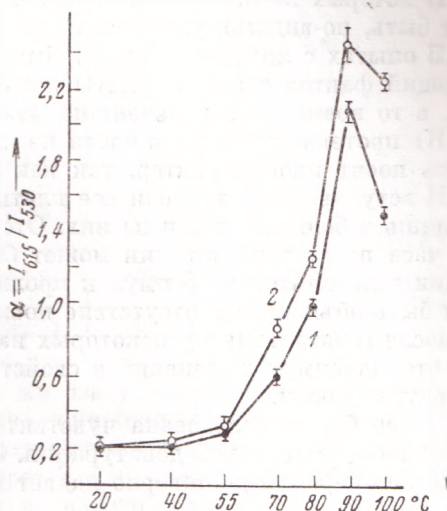


Рис. 3

Рис. 3. Кривые тепловой денатурации клеток интактной печени (1) и через 2,5 часа после гепатэктомии (2). I_{615} , I_{530} — интенсивность флуоресценции АО в ядрах

цепочечными и двуцепочечными участками ДНК, и вычисляется величина $\alpha = I_{615}/I_{530}$, которая пропорциональна степени денатурированности ДНП (⁹).

На рис. 1 представлены средние величины интенсивности зеленой люминесценции (I_{530}) АО, связанного с ДНП в различные сроки после гепатэктомии. Из рис. 1 видно, что способность ДНП гепатоцитов связывать АО практически не меняется через 45—90 мин. после операции. К 2,5 час. связывание АО возрастает в среднем на 20—25%, к 5 час. после гепатэктомии этот эффект значительно снижается. Известно, что синтез ДНК в печени в ответ на частичную гепатэктомию начинается не ранее, чем через 15—18 час. после операции. Это означает, что обнаруженные нами изменения в связывании АО клетками печени имеют в своей основе не колебания в количестве ДНК, а изменения в свойствах ДНП. Следует, однако, отметить, что возрастание связывания ядрами АО через 2,5 часа после операции было обнаружено не у всех животных, а приблизительно в 75% случаев (19 животных из 25 взятых в эксперимент).

В дальнейших опытах подробному исследованию были подвергнуты свойства ДНП печеночных клеток через 2,5 часа после частичной гепатэктомии. Для того чтобы объединить результаты всех опытов, вычисляли отношение интенсивности люминесценции АО в каждом ядре печени после

гепатэктомии к средней интенсивности люминесценции АО в ядрах того же животного до операции. Найденные таким образом отношения группировали по классам. Полученные распределения представлены в виде гистограмм (рис. 2). Распределение, характеризующее связывание АО ядрами неоперированной печени, близко к нормальному (рис. 2, а). После операции характер распределения изменяется: не наблюдается четко выраженного максимума, происходит сдвиг в сторону больших величин. Можно предположить, что это распределение представляет собой сумму двух распределений, одно из которых можно отнести к неизменным клеткам, а другое — к активированным гепатоцитам. Отношение частот встречаемости в одних и тех же классах левых частей обоих распределений до и после гепатэктомии позволяет приблизительно оценить число клеток, ДНП которых не изменился в результате операции. К таким клеткам может быть, по-видимому, отнесено около 20—30% всех гепатоцитов.

В опытах с лимфоцитами ⁽²⁾ было показано, что в ответ на стимулирующий фактор связывание АО повышается практически во всех клетках, в то время как дальнейшие этапы трансформации (синтез РНК и ДНК) протекают только в части из них. Обнаруженная нами закономерность носит иной характер, так как в регенерирующей печени в синтез ДНК вступают практически все клетки ⁽¹⁰⁾, а связывание АО повышается лишь в большей части из них. Отсутствие ответа в части клеток через 2,5 часа после гепатэктомии может быть объяснено асинхронностью реакции гепатоцитов на стимул к пролиферации. Этим обстоятельством может быть объяснено и отсутствие повышения связывания АО через 2,5 часа после гепатэктомии у некоторых из оперированных животных: возможно, что максимум изменений в свойствах ДНП сдвинут у этих животных на другие сроки.

Далее была исследована чувствительность ДНП клеток регенерирующей печени к тепловой денатурации. Оказалось (рис. 3), что через 2,5 часа после операции достоверно падает температура плавления ДНП гепатоцитов.

Было высказано мнение ⁽²⁾, что в основе наблюдаемых при активации клеток явлений лежат изменения во взаимодействии гистон — ДНК в комплексе дезоксирибонуклеопротеида, в результате чего увеличивается число мест в ДНК, способных связывать АО, и падает устойчивость ДНП при термальной денатурации. В работе, выполненной недавно на лимфоцитах лимфатических узлов ⁽¹¹⁾, эти представления были уточнены. Было установлено, что цитохимические изменения в свойствах ДНП, наблюдаемые при активации, могут быть искусственно воспроизведены с помощью экстракции из фиксированных клеток богатого лизинем гистона f_1 .

Этот подход был применен нами для исследования природы изменений в свойствах ДНП гепатоцитов после частичной гепатэктомии. Опыты (табл. 1) показали, что обработка фиксированных препаратов 0,6 М раствором хлористого натрия приводит к возрастанию связывания ядрами гепатоцитов АО и практически снимает различия между клетками в контроле и опыте. Аналогичные результаты были получены и в опытах по ацетилированию основных групп белка (табл. 1). Известно, что эта гистохимическая процедура воздействует в первую очередь на аминокислотные группы лизина ⁽¹²⁾, т. е. преимущественно на гистон f_1 .

Полученные данные позволяют заключить, что эффект активации хроматина клеток печени в основном связан с изменениями во взаимодействии с ДНК гистона f_1 . Это предположение нуждается, однако, в дальнейшей проверке, так как в результате воздействия 0,6 М раствором хлористого натрия из клеток, кроме гистона f_1 , могут удаляться также и негистоновые белки.

Следует рассмотреть возможные причины изменений в интенсивности связывания АО ядрами гепатоцитов в различные сроки после операции. Как уже упоминалось, все имевшиеся ранее сведения о закономерностях

активации ДНП были получены на клетках вне организма. При интерпретации данных опытов с регенерирующей печенью приходится учитывать более сложные закономерности. Эффект, обнаруженный при изучении динамики связывания АО с ДНП в течение первых пяти часов операции, является суммарным результатом двух процессов, протекающих параллельно и, видимо, с различной интенсивностью (выключение «ге-

Таблица 1

Влияние изменения свойств ДНП в результате частичной депротеинизации (I) и ацетилирования основных групп белков (II) на связывание АО (I_{530}) клетками печени до и после частичной гепатэктомии

Воздействие на ДНП	Интенсивность люминесценции АО (в отн. ед.)		$\frac{I_{оп} - I_K}{I_K}, \%$
	контроль (I_K)	через 2,5 часа после гепатэктомии ($I_{оп}$)	
I До экстракции белков	113±2	155±2,2	37
После обработки 0,6 M NaCl	162±4,6	177±4	9
II Без ацетилирования	111±2	138±2,2	24
После ацетилирования	360±11	388±5	5

нов роскоши» и включение «генов митоза»). Преобладание процесса повышения связывания АО над его понижением, обнаруженное через 2,5 часа после операции, хорошо коррелирует с имеющимися сведениями о том, что именно в эти сроки (через 3 часа после гепатэктомии) было выявлено усиление суммарной интенсивности синтеза РНК (¹³).

Полученные в данной работе факты подтверждают представление (¹⁴) о сложном характере изменений, протекающих в неделящихся клетках в ранние сроки после получения ими стимула к пролиферации, т. е. в так называемом пререпликативном периоде.

Институт молекулярной биологии
Академии наук СССР
Москва

Поступило
20 IV 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ R. Rigler, Acta physiol. scand., 67, Suppl., 267 (1966). ² N. R. Ringertz, Handbook of Molecular Cytology, Amsterdam — London, 1969, p. 656. ³ D. Killander, R. Rigler, Exp. Cell. Res., 39, 701 (1965). ⁴ Н. Г. Виноградова, А. В. Зеленин, ДАН, 208, 707 (1973). ⁵ L. Bollund, N. R. Ringertz, H. Harris, J. Cell Sci., 4, 71 (1969). ⁶ И. М. Шапиро, В. А. Колесников и др., Онтогенез, 3, 618 (1972). ⁷ W. Donkhaus, D. Heimer, Gerontologia, 16, 1 (1970). ⁸ R. Rigler, D. Killander, Exp. Cell Res., 54, 171 (1969). ⁹ R. Rigler, D. Killander et al., Exp. Cell Res., 55, 215 (1969). ¹⁰ E. Stöcker, Verhandl. Deutsch. Gesellsch. Pathol., 50, 53 (1966). ¹¹ А. В. Зеленин, Н. Г. Виноградова, Exp. Cell Res., in press. ¹² А. Дейч, Введение в количественную цитохимию, М., 1969, стр. 366. ¹³ A. H. McArdle, R. H. Greaser, Biochim. et biophys. acta, 68, 561 (1963). ¹⁴ W. S. Bullough, Nature, 199, 859 (1963).