

Г. Г. ГАСПАРЯН, В. В. ТЕРСКИХ, Ю. А. МАГАЯН

**ПРОЯВЛЕНИЕ АНТИГЕНОВ ГРУПП КРОВИ В КУЛЬТУРЕ  
ДИПЛОИДНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЭМБРИОНА ЧЕЛОВЕКА**

*(Представлено академиком В. А. Энгельгардтом 30 VII 1974)*

Переход культуры клеток из логарифмической фазы роста в стационарную связан с глубокими перестройками внутриклеточного метаболизма, свидетельствующими о том, что покоящиеся клетки стационарных культур находятся в особом физиологическом состоянии, отличном от состояния пролиферирующих клеток (<sup>1</sup>). Существенные различия обнаружены в составе и структуре поверхностной мембраны стационарных и пролиферирующих клеток (<sup>2</sup>), в том числе и в проявлении антигенов групп крови. Так, в культуре клеток почки кролика РК 13 наибольшее число клеток, положительных по антигену группы крови А (А<sup>+</sup>) было отмечено в период быстрого роста культуры (<sup>3</sup>). Имеются данные о том, что в культуре клеток мастоцитомы мыши Р815У пролиферирующие клетки являются В-положительными (В<sup>+</sup>), тогда как антиген Н у них не выявляется; в непролиферирующих же клетках наблюдается обратное соотношение (<sup>4</sup>). На основании приведенных сведений можно предположить, что антигены группы крови вовлекаются в процесс функциональной и структурной перестройки клеточной поверхности при смене состояний покоя и активной пролиферации клеток. Однако вопрос этот до настоящего времени специально не изучался.

В настоящей работе было исследовано проявление антигенов групп крови А и В в культуре диплоидных фибробластов эмбриона человека в процессе ее перехода из экспоненциальной фазы роста в стационарную, а также в ранние сроки последствия пролиферативного стимула в стационарной культуре клеток. В последнем случае предполагалось выяснить, является ли активация поверхностной мембраны клеток под воздействием индуктора условием, достаточным для перехода клеток к пролиферации.

В опытах использовали культуры фибробластов, полученные от двух эмбрионов человека (одна на 4-м, вторая на 16–18-м пассажах). В пенициллиновые флаконы с покровными стеклами наливали по 2 мл суспензии клеток (50 тыс./мл) в среде Игла с 10% сыворотки крупного рогатого скота и 100 мкг/мл канамицина. Через сутки после посева исходную среду заменяли на среду Игла без сыворотки. Для индукции синтеза ДНК в стационарной культуре клеток питательную среду на 12–14-е сутки роста культуры заменяли свежей, содержавшей 10% сыворотки.

Выявление антигенов группы крови А и В проводили методом непрямой иммуофлуоресценции. Покровные стекла с клетками промывали в растворе Хенкса, затем покрывали каплей сыворотки человека против соответствующей группы крови (Ortho Diagnostics, England) и инкубировали в течение 1 часа. После двукратного промывания в растворе Хенкса клетки покрывали каплей сыворотки кролика против  $\gamma$ -глобулинов человека, меченой изотиоцианатом флуоресцеина. Сыворотку предварительно абсорбировали ацетоновым порошком печени крысы. После инкубации в течение 1 часа и двукратного промывания покровные стекла накладывали на предметные клетками вниз. Инкубацию клеток с сыворотками и промывание препаратов проводили при 4° С.

На окрашенных препаратах определяли процент клеток, обладающих специфическим поверхностным свечением. Влажные препараты просматривали на микроскопе МЛ-3 при ультрафиолетовом и фазово-контрастном освещении. На каждый срок подсчитывали по 200–300 клеток на 4–6 препаратах. Клетку считали специфически окрашенной, если на ее периферии можно было наблюдать хорошо различимое зелено-желтое свечение в виде сплошного кольца, сектора или линии. Клетки, связавшие

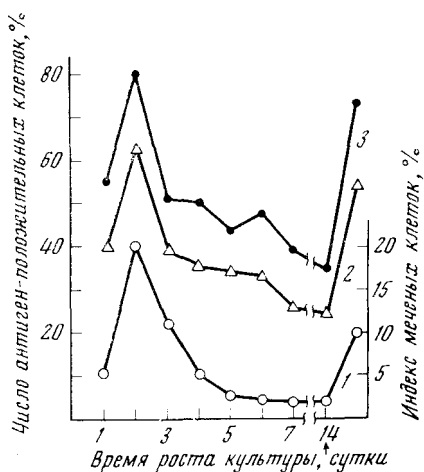


Рис. 1

Рис. 1. Число антиген-положительных клеток и индекс меченых клеток в культуре эмбриональных фибробластов человека. 1 — меченые клетки, 2 — A<sup>+</sup>-клетки, 3 — B<sup>+</sup>-клетки. Стрелкой обозначено время смены среды

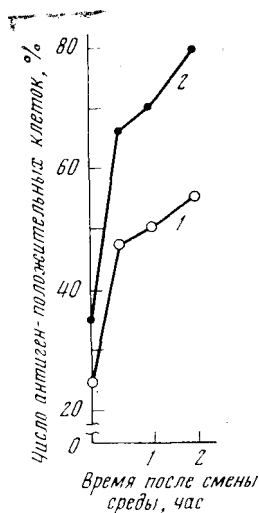


Рис. 2

Рис. 2. Усиление проявления антигенов групп крови A и B при индукции пролиферации клеток в стационарной культуре. 1 — A<sup>+</sup>-клетки, 2 — B<sup>+</sup>-клетки

краситель в виде точек или пиноцитозных гранул, не считались окрашенными. Диффузно окрашенные клетки не учитывались, поскольку такой тип окрашивания свидетельствует о гибели клетки (5).

Контролем серологической специфичности служила антисыворотка, истощенная равным объемом A- и B-положительных эритроцитов человека. Другим доказательством специфичности реакции было отсутствие окрашивания фибробластов китайского хомячка перевиваемой линии 431. Показателем темпа пролиферации культуры служило число клеток, вступивших в период синтеза ДНК. Для определения этого показателя клетки метили H<sup>3</sup>-тимидином (2 мкС/мл; удельная активность 4,1 С/ммоль) в течение 30 мин. до фиксации. На автографах, полученных по методике, описанной ранее (6), определяли индекс меченых клеток (из 1000 клеток на каждый срок).

Максимальный темп пролиферации в культуре эмбриональных фибробластов человека наблюдался на 2-е сутки роста, когда индекс меченых клеток был равен 20%. В это же время достигало максимума число A<sup>+</sup>- и B<sup>+</sup>-клеток (63 и 80% соответственно). Ни в одном из экспериментов не наблюдалось окрашивания всех клеток, что, возможно, свидетельствует о присутствии в составе клеточных популяций клеток, негативных по антигенам групп крови (7, 8). В последующие дни роста культуры проявление антигенов уменьшалось, достигая наименьших значений к 7-м суткам (A<sup>+</sup>=26%; B<sup>+</sup>=38%). К этому времени культура клеток находилась уже в стационарной фазе роста (индекс меченых клеток не превышал

3%). Низкий уровень проявления антигенов сохранялся, с небольшими вариациями, вплоть до 14-х суток роста культуры ( $A^+=24\%$ ;  $B^+=35\%$ ; индекс меченых клеток 2,8%) (рис. 1).

Таким образом, в настоящей работе показано уменьшение числа  $A^+$ - и  $B^+$ -клеток при выращивании эмбриональных фибробластов человека без смены среды, что согласуется с результатами опытов Доусон и Френкса (3) и Томаса (4), обнаруживших уменьшение соответственно  $A^+$ - и  $B^+$ -клеток в стационарной фазе роста клеточных культур.

Наблюдавшееся снижение числа антиген-положительных клеток в стационарной культуре может являться результатом феномена «маскирования» антигенов поверхности. Показано, что в стационарной культуре фибробластов хомячка линии NIL содержание и скорость синтеза форсмановского липидного гаптена выше, а проявление его ниже, чем в пролиферирующей культуре. «Маскированные» форсмановские антигены удается обнаружить при обработке клеток версеном (9). Увеличение проявления антигенов происходит и при обработке клеток некоторыми ферментами (10). Возможным объяснением этих данных может быть предположение о пространственных изменениях компонентов клеточной поверхности в зависимости от состояния клеток (11).

При индукции пролиферации в стационарной культуре клеток индекс меченых клеток через 24 часа после смены среды увеличивался до 10%. Одновременно в стимулированной культуре резко повышалось, приближаясь к максимальным значениям, и проявление антигенов групп крови: числа  $A^+$ -клеток через 24 час. после смены среды было равно 54%,  $B^+$ -клеток — 73% (рис. 1). Увеличение числа антиген-положительных клеток начиналось сразу же после смены среды: уже через 30 мин. количество  $A^+$ -клеток возрастало до 47,5%, а  $B^+$  — до 66%. Этот процесс продолжался в течение, по меньшей мере, 2 час. (рис. 2), что свидетельствует об асинхронном ответе клеток на пролиферативный стимул.

Как видно из данных рис. 2, через 2 час. после смены среды число антиген-положительных клеток приближалось к максимальным значениям, отмеченным для пролиферирующей культуры ( $A^+=55\%$ ;  $B^+=79\%$ ). Очевидно, что при индукции клеточной пролиферации в процесс изменения поверхностной мембраны клеток, приводящий к выявлению антигенов A и B, включалась подавляющая часть клеток популяции.

Если сопоставить индекс меченых клеток через 24 часа после смены среды (10%) с числом клеток, реагирующих на смену среды проявлением антигенов, то можно видеть, что только небольшой процент реагирующих клеток в дальнейшем переходит к пролиферации. В связи с этим интересны данные Шоделла и Иссельбахера (12), показавших, что другая ранняя реакция клеток на пролиферативный стимул — изменение проницаемости поверхностной мембраны — не ведет сама по себе к последующему размножению клеток. К такого же рода ранним реакциям клеток на воздействие индуктора, типичным, но недостаточным для последующей пролиферации, следует, очевидно, отнести также происходящие в первые часы после смены среды ускорение синтеза РНК (13, 14) и возрастание концентрации белковых SH-групп (15).

Таким образом, в настоящей работе показано, что антигены групп крови A и B вовлекаются в процессы изменения клеточной поверхности, обусловленные переходом культуры клеток из одной фазы роста в другую. На основании полученных результатов индукция клеточной пролиферации в стационарной культуре представляется комплексным процессом, включающим в себя раннюю активацию поверхностной мембраны клеток, которая, однако, является недостаточным условием для перехода клеток к синтезу ДНК и последующему размножению.

Авторы выражают глубокую благодарность И. С. Башкаеву за обсуждение результатов и активную помощь на всех этапах работы, а также В. Е. Барскому и Е. Н. Хачатурову за помощь в проведении эксперимента.

Институт зоологии  
Академии наук АрмССР  
Ереван  
Институт молекулярной биологии  
Академии наук СССР  
Москва

Поступило  
18 VII 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> В. В. Терских, Клеточный цикл, М., 1973, стр. 165. <sup>2</sup> A. Pardee, In vitro, v. 7, Baltimore, 1971, p. 95. <sup>3</sup> A. Dawson, D. Franks, Exp. Cell Res., v. 47, 377 (1967). <sup>4</sup> D. B. Thomas, Nature, v. 233, 317 (1971). <sup>5</sup> О. М. Лежнева, Иммунохимический анализ, М., 1968, стр. 189. <sup>6</sup> В. В. Терских, Е. В. Зорин, Цитология, т. 13, 1396 (1971). <sup>7</sup> D. Franks, A. Dawson, Exp. Cell Res., v. 42, 543 (1966). <sup>8</sup> D. Franks, Biol. Rev., v. 43, 17 (1968). <sup>9</sup> S. Hakomori, S. Kijimoto, Nature New Biol., v. 239, 87 (1972). <sup>10</sup> K. D. Noonan, M. M. Burger, J. Cell Biol., v. 59, 134 (1973). <sup>11</sup> M. M. Burger, Federat. Proc., v. 32, 91 (1973). <sup>12</sup> M. Shodell, K. Isselbacher, Nature New Biol., v. 243, 83 (1973). <sup>13</sup> S. L. Rhode, K. A. O. Eltem, Exp. Cell Res., v. 53, 184 (1968). <sup>14</sup> Г. Г. Гаспарян, Биол. журн. Армении, т. 28, 6 (1974). <sup>15</sup> Г. Г. Гаспарян, Ю. А. Магакян, В. В. Терских, Биол. журн. Армении, т. 28, 3, 28 (1974).