

УДК 591.178 : 591.044 + 576.32

ЦИТОЛОГИЯ

Н. И. АРРОНЕТ, Е. И. ДЕНЬКО

ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ГИДРОСТАТИЧЕСКОГО ДАВЛЕНИЯ НА РАСТИТЕЛЬНЫЕ И ЖИВОТНЫЕ КЛЕТКИ И НА КЛЕТОЧНЫЕ МОДЕЛИ ПРИ ИХ ТЕПЛОВОМ ПОВРЕЖДЕНИИ

(Представлено академиком Е. М. Крепом 15 I 1973)

Существует большое количество веских, но косвенных фактов, говорящих о том, что в основе теплового повреждения клетки — животной и растительной — при интенсивном краткосрочном нагреве лежат денатурационные изменения их белков. Каждый из фактов такого рода, взятый в отдельности, имеет силу не доказательства, а лишь довода в пользу приведенного положения. Поэтому можно говорить только о степени его доказательности, и эта степень повышается с увеличением числа таких фактов-доводов.

О денатурации цитоплазматических белков как механизме теплового повреждения клеток свидетельствует сходство — качественное и количественное — действия нагревания на клетки, с одной стороны, и на выделенные белки — с другой. Так, процессам и теплового повреждения клеток, и тепловой денатурации белков свойствен высокий температурный коэффициент Q_{10} — порядка сотен и тысяч. При этом существенно, что из процессов, которые протекают или могут протекать в клетке, столь высоким Q_{10} обладают только денатурация белка и набухание крахмала; очевидно, что из этих двух процессов только в первом можно заподозрить причину повреждения клетки. При тепловом повреждении повышаются мутность и вязкость как цитоплазмы, так и белков *in vitro*; возрастает способность к сорбции ряда витальных красителей и у клеток, и у изолированных белков. Одноименные белки, выделенные из клеток, отличающихся по своей теплоустойчивости, как правило, тоже обладают разной термостабильностью, коррелирующей с таковой клеток, из которых они получены.

Ряд фактов такого рода получен на клетках мерцательного эпителия лягушек. Этот объект удобен по следующим причинам. О поврежденности этих клеток легко судить по остановке работы их ресничек. Из ресничных клеток удастся изолировать и затем изучать их двигательный аппарат (глицеринизированные модели мерцательного эпителия, состоящие из структурированных сократительных белков, хотя и содержащие, кроме того, липоидные мембранные компоненты). «Модельные» реснички ритмично мерцают при введении в среду АТФ. Благодаря этому можно сравнивать устойчивость к повреждению двигательной функции клеток и белкового, в первом приближении, субстрата этой же самой функции. С помощью этих объектов — клеток мерцательного эпителия лягушек и глицеринизированных моделей тех же клеток — было показано, что теплоустойчивость функции мерцания ресничных клеток определяется теплоустойчивостью их белкового двигательного аппарата, а тепловое повреждение последнего, по всей видимости, состоит в денатурационных изменениях образующих его белков⁽¹⁻³⁾.

Сходство реакции белков и клеток подтверждается группой фактов, указывающих на модифицирующее влияние тех или иных агентов на устойчивость к нагреванию белков и клеток. Ряд веществ — сахара, глице-

рин, аминокислоты, D_2O — повышают устойчивость белков к нагреванию. Оказалось, что эти вещества аналогично влияют на клетки: они повышают теплоустойчивость животных и растительных клеток (²⁻⁸). От тепловой денатурации белки защищает также гидростатическое давление, приложенное одновременно с нагреванием в дозах 100—1300 ат. Давление более высокой интенсивности само является денатурирующим белки агентом.

В экстракте из *Bacillus stearothermophilus* малатдегидрогеназа под давлением в 1100—1300 ат работает даже при 101°; при атмосферном же давлении она полностью инактивируется при 80° (⁹). Пирофосфатаза из этих же бактерий при 90° практически инактивируется. Однако, если это нагревание производится на фоне гидростатического давления в 100—700—1100 ат, фермент работает, сохраняя, соответственно, 62—66—50% своей нормальной активности. На фоне давления в 500—700 ат пирофосфатазная активность сохраняется даже при 105° (¹⁰). Тепловая инактивация дрожжевой инвертазы, вызываемая нагреванием фермента при температурах выше 60°, предотвращается давлением в 680 ат (¹¹). Нагревание экстракта люциферазы из светящихся бактерий *Achromobacter fischeri* подавляет люминесценцию этого фермента; умеренно высокое гидростатическое давление защищает люциферазу от тепловой инактивации (¹²). 85% белка ВТМ в результате 4-часового нагревания при 69° выпадает в осадок. При таком же нагревании, но под давлением в 680 ат осаждается лишь 10% этого белка (¹³). Тонгур показал, что с помощью гидростатического давления можно не только предотвратить тепловую денатурацию цельного яичного белка и яичного альбумина, но даже репарировать предварительно денатурированные нагреванием белки — перечисленные, а также сывороточный альбумин (¹⁴⁻¹⁶).

Механизм защитного действия давления в отношении тепловой денатурации белков, по-видимому, состоит в следующем. Тепловая денатурация ведет к увеличению парциального объема белковых молекул, что является следствием их разворачивания. Это показано на химотрипсиногене (¹⁷), рибонуклеазе (¹⁸), яичном и сывороточном альбуминах, на сывороточном глобулине (¹⁹); причем в ряде случаев — с помощью прямых dilatометрических измерений. Увеличение объема для разных белков составляет 100—150 мл/моль. Гидростатическое давление препятствует увеличению объема белковых молекул и тем самым их разворачиванию, их тепловой денатурации, смещая равновесие нативный белок $\rightleftharpoons$ денатурированный белок влево.

Относительно того, наблюдается ли на клетках то же, что на выделенных белках, — препятствует гидростатическое давление повреждающему действию нагревания, в литературе имеются данные, полученные лишь на бактериальных клетках. Так, давление в 350—550 ат снимает бактерицидное действие на *Escherichia coli* нагревания при 47—50°, которое наблюдается в случае такого нагревания при атмосферном давлении (²⁰). Споры *Bacillus subtilis* при 93,6° в течение 30 мин. теряют жизнеспособность, но если это прогревание производится на фоне давления в 600 ат, то 14% спор сохраняет жизнеспособность (²¹). Наконец, интенсивность люминесценции *Photobacterium phosphoreum* подавляется при повышенных температурах, но давление порядка 130—150 ат защищает свечение этих бактерий от тепловой инактивации (²²).

Нашей задачей было распространить эти исследования на клетки высших растений и животных. Опыты ставились на эпидермальных клетках листа *Tradescantia fluminensis* Vell. и на ресничных клетках эпителия нёба и пищевода *Rana temporaria* L.; параллельно ставились аналогичные опыты и на белковом препарате, в качестве которого брались глицеринизированные модели клеток мерцательного эпителия яйцевода травяной лягушки. Определялась устойчивость этих клеток и клеточных моделей к 5-минутному действию нагревания при атмосферном давлении

(контроль) и при одновременном действии повышенного гидростатического давления (опыт). О теплоустойчивости судили по температуре, прекращающей: а) движение цитоплазмы в эпидермальных клетках листа, б) мерцание ресничек эпителиальных клеток, в) работу ресничек модельных клеток, вызываемую АТФ.

Для нагревания под давлением испытываемые объекты заключались в небольшую пробирку с соответствующей жидкостью (для кусочков листа — водопроводная вода, для кусочков слизистой — раствор Рингера,

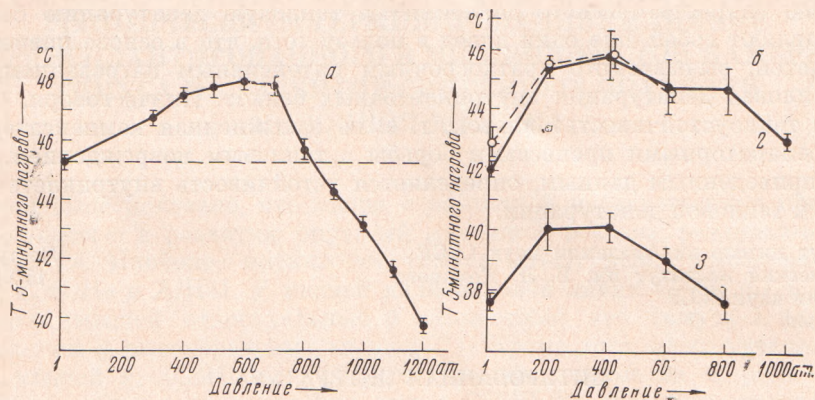


Рис. 1. Влияние гидростатического давления на устойчивость к 5-минутному нагреванию клеток эпидермиса листа *Tradescantia fluminensis* (а) и мерцательных клеток пёба (1), яйцевода (2) и глицеринизированных моделей клеток яйцевода (3) *Rana temporaria* (б). Точка, соответствующая нагреву при 1 ат, характеризует уровень теплоустойчивости в контроле, показанный горизонтальной пунктирной линией

для глицеринизированных моделей, приготовленных, как описывалось ранее (¹⁻³), и отмытых от глицерина, — солевой раствор: 0,12 М КСl, 0,02 М трис-малеиновый буфер, рН 7,0) при комнатной температуре, а пробирка помещалась в нагретую до заданной температуры стальную бомбу, которая находилась на площадке пресса высокого давления в водяной бане. Баня была соединена с водным ультратермостатом, благодаря чему через нее непрерывно циркулировала вода нужной температуры. С того момента как пробирка с материалом помещалась в полость бомбы, также заполненную водой из бани, начиналось постепенное нагревание объекта в пробирке, и одновременно в бомбе создавалось повышенное гидростатическое давление. Время воздействия нагревом исчислялось с момента установления в бомбе требуемого давления; временем прогревания пробирки до начала давления приходилось пренебрегать, но при соблюдении всех условий близкими оно не могло сильно варьировать от опыта к опыту и составляло 1—1,5 мин. По истечении 5 мин. давление снималось, пробирка вынималась из бомбы, материал быстро переносился в среду комнатной температуры и микроскопировался для выяснения, соответственно, того, движется ли цитоплазма в клетках традесканции, мерцают ли реснички в клетках лягушки, работоспособны ли модели после данного воздействия или нет. Контрольные опыты ставились так же, но при этом в нагретой бомбе с материалом повышенного давления не создавалось.

Результаты опытов, представленные на рис. 1, показывают, что изученные растительные и животные клетки, а также модели последних значительно более устойчивы к нагреванию, если оно производится при одновременном действии гидростатического давления от 200—300 до 700—800 ат. Иначе говоря, умеренно высокое гидростатическое давление защищает растительные и животные клетки, а судя по опытам на мо-

делях — их белки от теплового повреждения. Максимальный защитный эффект давления на теплоустойчивость растительных клеток составляет 2,6° (давление 500—700 ат), на животные клетки 3,7° (давление 400 ат), на их модели 2,5° (давление 200—400 ат). Давления выше 800—1000 ат не только не оказывают защитного эффекта, а, напротив, снижают теплоустойчивость клеток, выступая в роли повреждающего агента, действие которого на эти же объекты было описано раньше (⁵, ²³, ²⁴).

Полученные результаты в сопоставлении с данными по защитному действию гидростатического давления на тепловую денатурацию белков представляют собой еще один довод в пользу того, что в основе повреждения клеток, вызываемого краткосрочным интенсивным нагреванием, лежит тепловая денатурация внутриклеточных белков. Иначе говоря, «первичная теплоустойчивость» клеток, т. е. не осложненная компенсаторными и репараторными процессами борьбы с тепловым повреждением, согласно приведенным данным, определяется устойчивостью внутриклеточных белков к тепловой денатурации.

Институт цитологии Академии наук СССР
Ботанический институт им. В. Л. Комарова
Академии наук СССР
Ленинград

Поступило
15 XI 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. И. Арронет, ДАН, 157, 437 (1964). ² Н. И. Арронет, Мышечные и клеточные сократительные (двигательные) модели, Л., 1971. ³ N. J. Aronnet, *Muscle and Cell Motile Models*, N. Y.—London, 1972. ⁴ Н. Л. Фельдман, Цитология, 4, 633 (1962). ⁵ Н. И. Арронет, Цитология, 6, 432 (1964). ⁶ В. Я. Александров, Д. Д. Табидзе, Цитология, 15, № 1 (1973). ⁷ В. Я. Александров, Н. И. Арронет и др., Цитология, 6, 667 (1964). ⁸ V. Ya. Alexandrov, N. J. Aronnet et al., *Federat. Proc.*, 25, 1, Part 2, 128 (1966). ⁹ R. Y. Morita, R. D. Haight, *J. Bacteriol.*, 83, 1341 (1962). ¹⁰ R. Y. Morita, P. J. Mathemeier, *J. Bacteriol.*, 88, 1667 (1964). ¹¹ F. H. Johnson, W. J. Kauzmann, R. L. Gensler, *Arch. Biochem.*, 19, 229 (1948). ¹² B. L. Strehler, F. H. Johnson, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 40, 606 (1954). ¹³ F. H. Johnson, M. B. Baylor, D. Fraser, *Arch. Biochem.*, 19, 237 (1948). ¹⁴ В. С. Тонгур, Бюлл. эксп. биол. и мед., 26, 440 (1948). ¹⁵ В. С. Тонгур, Н. А. Казьмина, Биохимия, 15, 221 (1950). ¹⁶ В. С. Тонгур, Биохимия, 17, 495 (1952). ¹⁷ J. F. Brandts, R. Lumry, *J. Phys. Chem.*, 67, 1484 (1963). ¹⁸ D. N. Holcomb, K. E. Van Holde, *J. Phys. Chem.*, 66, 1999 (1962). ¹⁹ E. Heymann, *Biochem. J.*, 30, 127 (1936). ²⁰ F. H. Johnson, *J. Cell. and Comp. Physiol.*, 28, 23 (1946). ²¹ F. H. Johnson, C. E. Zobell, *J. Bacteriol.*, 53, 359 (1949). ²² F. H. Johnson, In: *Microbiol. Ecology*, VII Symp. Soc. Gen. Microbiol., Cambridge, 1957, p. 134. ²³ В. Я. Александров, Н. Л. Фельдман, Бот. журн., 43, 194 (1958). ²⁴ Н. И. Арронет, М. Ф. Константинова, Цитология, 6, 743 (1964).