

В. Б. МАМАЕВ, Л. К. ОБУХОВА, Л. И. КАЛИНИНА,
Т. М. СКВОРЦОВА, Л. Г. СТЕПАНОВА, О. Г. АНДЖАПАРИДЗЕ

ИЗОФЕРМЕНТЫ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ КЛЕТОК ДИПЛОИДНЫХ ШТАММОВ

(Представлено академиком А. Е. Браунштейном 10 XII 1974)

Использование диплоидных клеток человека как модели для изучения молекулярно-биологических процессов, привлекает внимание биохимиков, так как позволяет изучить механизмы воздействия химических препаратов на процесс старения и малигнизацию клеток человека; позволяет упростить решение проблемы старения и злокачественной трансформации; позволяет выяснить, является ли данный изучаемый биохимический параметр неотъемлемой чертой старения или адаптивным нейрогуморальным изменением.

Вместе с тем, использование клеточных культур для решения этих проблем предполагает установление связи между состоянием клеток *in vitro* и *in vivo*. С этой целью исследованы изоферменты лактатдегидрогеназы, КФ 1.1.1.27. (ЛДГ), как наиболее универсальной паспортной характеристики функциональной активности генома клетки. На основании большого фактического материала можно утверждать, что не подлежат сомнению факты тесной корреляции спектра изоферментов ЛДГ с уровнем дифференцировки клетки (¹), отчетливой тканевой специфичности спектра изоферментов ЛДГ (²), изменения соотношения изоферментов ЛДГ в процессе эмбриогенеза, связи синтеза ЛДГ с фазами митотического цикла клетки (³).

Исученные штаммы были получены из нормальных легочной, мышечной и кожной тканей 14,5-недельного эмбриона человека. Исходные ткани имели структуру, характерную для данных органов. Для дезагрегации тканей использовали метод трипсинизации. Клетки культивировали в двухкратной среде Игла («NBC») с добавлением 10% телячьей сыворотки. Перебев клеток производили два раза в неделю в отношении 1:2 в концентрации $65 \cdot 10^3$ клеток/мл. В результате были получены три штамма диплоидных клеток: легочный Л-63, кожномышечный КМ-172, кожный К-172. Полученные штаммы соответствовали всем требованиям, которые установлены для диплоидных клеточных штаммов Международным Комитетом по клеточным культурам (⁴). Часть клеток на восьмом пассаже была заморожена и хранилась при температуре жидкого азота в течение нескольких месяцев.

Морфологическое изучение культур клеток, проведенное на нативных и окрашенных гематоксилином-эозином препаратах, показало, что на первом пассаже культура клеток легочного штамма в основном состояла из фибробластоподобных клеток. Среди клеток кожномышечной культуры встречались миосимпласты, количество которых уменьшалось на втором пассаже, а затем они исчезали вовсе. С первых пассажей монослой имел характерный для диплоидных клеток рисунок. С четвертого пассажа клеточные штаммы были морфологически неразличимы.

Для определения активности изоферментов ЛДГ клетки трижды промывали раствором Хенкса, осадок ресуспендировали в экстракционной среде (⁵) и гомогенизировали в гомогенизаторе Нейфаха (⁶) в течение 1 мин. и затем центрифугировали при 105 000 g в течение 1 часа при 4° (⁴). Над-

Таблица 1

Распределение изоферментов ЛДГ клеток человека в процессе культивирования (второй день роста; метод энзимэлектрофореза)

Пасса-ж	Клетки	n *	Изоферменты, %				
			H ₄	H ₃ M	H ₂ M ₂	HM ₃	M ₄
	Легкого	2	13,4	56,5	28,7	1,5	0
	Мышцы	2	3,1	16,7	75,5	5,0	0
	Кожн	2	7,9	39,3	49,9	3,0	0
4	Л-63	2	1,3	21,3	37,6	38,3	1,4
4	KM-172	2	0	4,0	16,6	71,3	8,3
3	K-172	2	0	7,7	10,0	78,8	3,6
6	Л-63	2	1,4	38,1	10,3	48,9	1,3
6	KM-172	2	0	10,2	15,9	71,5	2,3
5	K-172	2	0	12,4	10,9	66,8	10,0
8	Л-63	2	1,5	25,3	32,6	38,9	1,5
8	KM-172	2	0	4,4	33,8	59,3	2,4
7	K-172	2	0	5,5	24,6	66,5	3,4
13	Л-63 **	3	0,1	9,1±0,3	59,6±1,1	30,1±1,4	1,2±0,1
13	KM-172 **	3	0	5,4±0,5	43,8±0,2	46,1±0,7	4,7±0,1
12	K-172 **	2	0	2,9	36,7	52,2	8,3
21	Л-63 **	3	0	6,0±0,1	55,2±0,3	36,2±0,4	2,5±0,0,4
20	KM-172 **	3	0	4,2±0,1	46,5±0,9	44,2±0,8	5,1±0,1
18	K-172 **	2	0	2,0	29,5	53,4	15,1
21	Л-63	3	0	12,4±0,3	52,2±0,5	32,1±0,1	3,3±0,3
21	KM-172	3	0	5,2±0,3	46,3±0,8	40,9±0,5	7,7±0,9
21	K-172	2	0	1,5	31,0	48,2	19,2
25	Л-63	3	0	4,8±0,6	38,2±0,7	47,8±0,4	9,1±0,2
25	KM-172	3	0	3,3±0,1	34,7±0,5	49,9±0,03	12,5±0,1
25	K-172	2	0	1,6	21,1	59,0	18,3
26	Л-63 **	3	0	4,9±0,04	49,5±0,1	42,2±0,1	3,4±0,2
26	KM-172 **	3	0	3,9±0,1	43,2±0,1	46,8±0,3	6,1±0,4
26	K-172 **	2	0	2,1	37,1	52,6	8,2
35	Л-63 **	3	0	4,3±0,1	51,8±1,4	39,6±1,0	4,29±0,4
35	KM-172 **	3	0	3,0±0,2	34,5±0,9	32,6±1,1	9,9±0,1
35	K-172 **	2	0	1,87	32,5	57,1	8,55
46	Л-63 **	4	0	6,8±0,4	52,6±0,6	37,9±0,7	2,7±0,3
46	KM-172 **	4	0	6,7±0,4	52,3±0,4	38,3±0,4	2,7±0,1

* Число измерений.

** Размороженные субштаммы.

Таблица 2

Распределение изоферментов ЛДГ в диплоидных клетках человека (второй день роста; метод ингибирования мочевиной)

Пасса-ж	Клетки	Изоферменты, %			
		H ₄	H ₃ M	H ₂ M ₂	HM ₃ +M ₄
3	Л-63	1,4±0,1	15,5±1,7	37,6±1,7	45,9±0,3
3	K-172	0	3,3	23,1	73,3
4	Л-63	6,1	18,5	25,8	49,6
4	K-172	0	5,7	26,1	68,8

осадочную жидкость хранили при 0° и при -70°. Активность фермента измеряли по методу Бергмейера (7) на спектрофотометре СФ-4, снабженном регистрирующей приставкой (8).

Данные о распределении изоферментов ЛДГ, полученные методом энзимэлектрофореза в расщепленном полиакриламидном геле (9-11), представлены в табл. 1. На третьем и четвертом пассажах спектр изоферментов ЛДГ изучали также методом Чазова, основанном на ингибировании ЛДГ

различными концентрациями мочевины (¹²). Эти данные представлены в табл. 2.

Из полученных результатов можно сделать следующие выводы: 1) качественная картина соотношения изоферментов ЛДГ в исходных эмбриональных тканях соответствует сведениям, известным из литературы (¹³); 2) несмотря на то, что начиная с четвертого пассажа клеточные штаммы были морфологически неразличимы, при последующем культивировании клеток диплоидных штаммов не происходит унификации распределения изоферментов ЛДГ; 3) хотя и наблюдались некоторые колебания спектра изоферментов от эксперимента к эксперименту, различие распределения изоферментов клеток штаммов Л-63 и КМ-172 сохраняется вплоть до 46 пассажа. Достоверность различия спектра изоферментов клеток этих штаммов на 4, 6, 8, 13, 24, 25 и 26 пассажах рассчитали методом парного сравнения и установили, что вероятность различия для изоферментов M_4 и M_3H составляет более 0,99, для M_2H_2 — более 0,92, а для MH_3 — более 0,96; 4) полученные различия изоферментного состава были воспроизведены на размороженных клеточных штаммах, поэтому это различие нельзя объяснить методическими погрешностями культивирования клеток; 5) различие в распределении изоферментов ЛДГ изученных клеток было также подтверждено методом Чазова, принципиально отличным от метода энзим-электрофореза.

Таким образом, наиболее вероятной причиной различия спектра изоферментов ЛДГ штаммов Л-63 и КМ-172 можно считать разное тканевое происхождение, то есть морфологическая унификация клеток не свидетельствует об унификации работы генома. Эти предположения согласуются с данными Кайн и Прайнс (¹⁴), которые показали, что клоны клеток паренхимы печени, имеющие морфологию фибробластов, сохраняют способность синтезировать сывороточный альбумин, что присуще только клеткам печени.

Авторы приносят благодарность С. Е. Могилевичу, В. Н. Малахову, И. Г. Поцовой-Пресновой за техническую помощь.

Институт химической физики
Академии наук СССР

Институт вирусных препаратов
Москва

Поступило
10 XII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ J. Papaconstantinou, Science, v. 156, 338 (1967). ² D. J. Ecobichon, Canad. J. Biochem., v. 44, 1277 (1966). ³ R. R. Klevecz, Science, v. 166, 1536 (1969). ⁴ Minutes of the Sixth Meeting of the Committee on Cell Cultures, Bronx, N. Y., 1969. ⁵ C. E. Shonk, G. E. Boxer, Cancer Res., v. 24, 709 (1964). ⁶ Е. А. Нейфах, Лаб. дело, № 9, 570 (1964). ⁷ H. U. Bergmeyer, Methods of Enzymatic Analysis, N. Y., 1963, p. 736. ⁸ В. Б. Мамеев, В. П. Малахов, Л. К. Обухова, Вopr. мед. хим., № 2, 161 (1972). ⁹ A. A. Dietz, T. Lubrano, Anal. Biochem., v. 20, 246 (1967). ¹⁰ A. A. Dietz, T. Lubrano, H. M. Rubinstein, Clin. Chim. acta, v. 27, 225 (1970). ¹¹ Полиакриламидный электрофорез белков и ферментов, М., 1971, стр. 45. ¹² Е. И. Чазов, В. Н. Малахов и др., Кардиология, № 11, 5 (1972). ¹³ R. P. Francesconi, C. A. Villee, Life Sci., v. 8, 33 (1969). ¹⁴ M. E. Kaighn, A. M. Prince, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 68, 2396 (1971).