

© 1991

ТРАНСПОРТ И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ МОНОВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ ПРИ БЛАСТТРАНСФОРМАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА, АКТИВИРОВАННЫХ ФИТОГЕМАГГЛЮТИНИНОМ

А. А. Веренинов, Е. В. Гусев, О. М. Казакова, Е. М. Клименко, И. И. Марахова,
В. В. Осипов, Ф. В. Торопова

Институт цитологии АН СССР, С.-Петербург

Проведено комплексное исследование бласттрансформации лимфоцитов периферической крови человека, активированных фитогемагглютинином. На протяжении 72 ч начиная с первых 0.5 ч прослежены изменения потоков и содержания калия и натрия, распределение клеток по размеру и содержанию ДНК, скорость синтеза ДНК и белка. Выявлена гамма «ранних» и «поздних» изменений транспорта калия и натрия, которые включают в себя начальное возрастание входного потока калия, стадию, относящегося к Na,K-ATФазной системе, увеличение убаин-резистентного потока калия, стадию снижения содержания калия и характерную динамику изменения содержания натрия. Установлено, что на определенной стадии активации лимфоцитов, предшествующей репликации ДНК, наблюдается комплекс «поздних» ионных изменений, сопровождающихся увеличением удельного содержания калия в расчете на 1 г белка и возрастанием отношения K^+/Na^+ . Эти изменения совпадают с увеличением размеров клеток и массы клеточного белка и снимаются циклогексимидом. Сделан вывод о том, что в случае перехода к пролиферации лимфоцитов периферической крови человека имеет место та же закономерность, которая была установлена авторами ранее для пролиферирующих клеток постоянных клеточных линий, и что высокое удельное содержание калия на единицу сухой массы клеток является характерным признаком подготовки клеток к пролиферации.

В последнее время растет интерес к исследованию роли моновалентных ионов в регуляции функций невозбудимых клеток, и лимфоциты стали одним из популярных объектов в такого рода работах. Тем не менее изменения транспорта и распределения калия и натрия между клетками и средой при переходе покоящихся лимфоцитов к пролиферации остаются малоисследованной областью. Изучаются главным образом ранние изменения, связанные с начальным звеном в цепи реакций, ведущих к митогенному ответу (Гуковская, 1984; Hadden, 1988; Grinstein, Dixon, 1989). Опыт исследования ионного транспорта в культурах постоянных клеточных линий и анализ литературных данных привели нас к выводу о том, что переход клеток к пролиферации сопровождается закономерными изменениями транспорта и распределения моновалентных катионов, в частности увеличением содержания калия в расчете на 1 г белка (Веренинов, Марахова, 1986; Марахова и др., 1987). Представлялось интересным выяснить, насколько установленные закономерности являются общими и проявляются ли они при переходе к пролиферации из состояния «естественного» покоя, как это имеет место у лимфоцитов периферической крови.

Материал и методика

Лимфоциты выделяли по общепринятой схеме (Войш, 1968) из донорской крови, полученной в тот же день, с использованием глицерина в качестве антикоагулянта. Для осаждения эритроцитов в кровь добавляли 6%-ный раствор декстрана (дексстран-500, Pharmacia) на физиологической среде (1:10) и через 15—20 мин начинали отбор лейкоцитарной фракции. По 3 мл суспензии лейкоцитов наслаивали на 8 мл среды Фиколл-пак (Pharmacia) или Фиколл-верографин с плотностью 1.077. После центрифугирования в течение 30 мин при 400g интерфазу переносили в пробирки объемом 12 или 50 мл и 2—3 раза промывали 0.9%-ным раствором NaCl с 10 мМ Трис- HCl или фосфатной средой следующего состава (мм): NaCl — 137, Na_2HPO_4 — 8, KCl — 2.7, KH_2PO_4 — 1.5. Далее лимфоциты инкубировали в течение ночи в CO_2 -инкубаторе во флаконах объемом 50—100 мл в 25—50 мл среды RPMI-1640 (Flow) с глутамином и 10% человеческой или эмбриональной телячьей сыворотки (Flow) без антибиотиков при концентрации клеток 1—2 млн. в 1 мл. На следующие сутки клеточную суспензию разливали в пенициллиновые флаконы по 2—4 млн. в 2 мл той же

среды и вносили фитогемагглютинин (ФГА-М, Calbiochem), конечная концентрация которого была 20 мкг/мл.

Через определенное время (обычно начиная с 30 мин и кончая 72 ч) часть флаконов брали для измерения исследуемых показателей. Для измерения входного потока рубидия за 30 мин до конца опыта во флаконы вносили по 50—100 мкл 50 мМ раствора RbCl, создавая конечную концентрацию 2.5—5.0 мМ. Приведенные далее значения потоков даны всюду в расчете на концентрацию Rb^{+} в среде 5 мМ. Убаин (Sigma) при необходимости вносили вместе с рубидием в конечной концентрации 0.1 мМ. Аналогично вносили циклогексимид (Sigma), который применяли в концентрации 10 мкг/мл.

Скорость включения тимидина и лейцина определяли в параллельных пробах. В этом случае перед внесением радиоизотопов из пенициллинового флакона с осадком клеток на дне осторожно удаляли половину надосадочной среды. В оставшуюся суспензию объемом 1 мл вносили 3H -тимидин («Изотоп») в конечной концентрации 370 кБк/мл и 2 мМ носителя ^{14}C -лейцин («Изотоп») в концентрации 92.5—111.0 кБк/мл. Концентрация лейцина-носителя в среде RPMI составляла 0.38 мМ.

В конце опыта суспензию переносили в конические пластиковые пробирки объемом 1.5 мл и центрифугировали в течение 3 мин при 3000g. Осадок клеток на дне пробирки 5 раз промывали холодным раствором $MgCl_2$ (85 мМ) без ресуспендирования. После промывки к осадку добавляли 1 мл трихлоруксусной кислоты (ТХУ). На следующие сутки в надосадочной среде определяли концентрацию K^{+} , Na^{+} и Rb^{+} . Определение катионов проводили с помощью эмиссионного анализа на атомно-абсорбционном спектрофотометре Перкин—Элмер AA-306 (Веренинов и др., 1982). В калибровочные растворы вводили ТХУ в концентрации 5%. Концентрация K^{+} , Na^{+} и Rb^{+} в пробах, как правило, составляла соответственно 50—200, 15—100 и 1—50 мкМ. Из надосадочного экстракта отбирали также пробу для определения количества внутриклеточного ^{14}C -лейцина, не включенного в белок («свободный аминокислотный пул»). После удаления остатков надосадочной среды к ТХУ-преципитату добавляли 0.5—1.0 мл NaOH (0.1 М). В этой части пробы определяли концентрацию 3H -тимидина, включенного в ДНК, и ^{14}C -лейцина, включенного в белок, а также концентрацию самого белка по Лоури.

Анализ контрольных «покоящихся» лимфоцитов, не подвергавшихся действию ФГА, проводили параллельно с первыми по времени образцами активированных лимфоцитов. Для морфологического анализа клетки фиксировали смесью спирта, формалина и уксусной кислоты (9 : 3 : 1) и окрашивали по Гимза.

Распределение по объему фиксированных клеток определяли с помощью сканирующего микроскопа Magiscan 2 (Joyce-Loebl) по предусмотренной в нем программе «Results», а распределение по объему живых клеток — с помощью оригинальной проточной фотометрической установки (Гусев и др., 1991). Анализ содержания ДНК в клетках проводили на проточном цитофотометре (Розанов, 1988).

В работе использовали соли квалификации «хч» и «осч» («Реахим»).

Результаты

Содержание в лимфоцитах калия¹ и натрия. После введения в культуру лимфоцитов ФГА удельное содержание в клетках калия в расчете на 1 г белка вначале падает (рис. 1). В среднем по 7 опытам, в которых измерение ионных показателей и цитометрию проводили в широком временном интервале, это снижение составляло 17% по отношению к исходному значению, равному 710 мкмоль/г (табл. 1). Оно могло наблюдаться уже на самом раннем из исследованных сроков, т.е. через 30 мин, однако чаще всего низкие значения приходятся на интервале 2—5 ч. Вслед за начальным снижением содержания калия следует медленный подъем. Через 8—16 ч содержание калия оказывается близким к исходному уровню, а затем идет более крутое нарастание примерно до 48 ч, за которым может наблюдаться падение. В 3 опытах нарастание продолжалось до 72 ч, а в 1 — только до 24 ч. Увеличение содержания калия по отношению к минимальному значению составляло 53%, а по отношению к исходному — 25%.

Динамика изменения содержания натрия существенно отличается от калиевой (рис. 1). Сначала имеет место примерно 5-часовое повышение содержания натрия, часть которого приходится на стадию снижения содержания калия, а часть — на начало повышения содержания калия. Затем содержание натрия падает, после чего в течение некоторого времени уровень натрия сохраняется стабильным. Позднее (48—72 ч) содержание натрия снова возрастает.

Просмотр данных, относящихся к разным опытам и разным донорам, показывает, что стадии изменения содержания калия и натрия могут быть по-разному смещены

¹ Под содержанием калия далее всюду подразумевается суммарное содержание калия и рубидия

относительно друг друга. Вероятно, поэтому график изменения отношения K^+/Na^+ от опыта к опыту и от донора к донору оказывается менее регулярным, чем изменение содержания калия или натрия, взятых сами по себе. При этом надо еще учитывать, что на отношении K^+/Na^+ не отражаются ошибки и разброс результатов, связанные с неодинаковым количеством клеток в пробах, их разведением, ошибками в определении содержания белка и т. п. Складывается впечатление, что отношение K^+/Na^+ не является показателем большой функциональной значимости, иначе оно регулировалось бы клетками более строго. Как бы то ни было, по соотношению изменений содержания калия и натрия можно выделить ряд стадий: 1) увеличение содержания натрия на фоне снижения концентрации калия, 2) увеличение содержания натрия на фоне медленного нарастания содержания

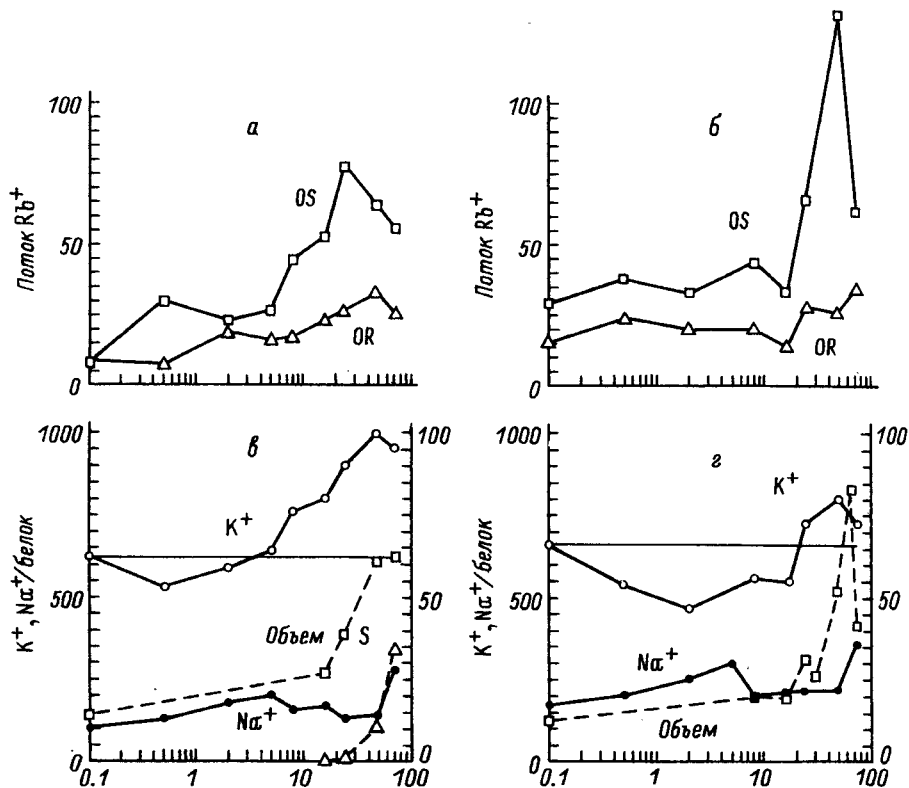


Рис. 1. Содержание K^+ и Na^+ , входной поток Rb^+ , объем клеток и доля клеток, находящихся в S-периоде (S), в процессе бласттрансформации лимфоцитов крови человека, активированных фитогемагглютинином.

По оси абсцисс — время культивирования, ч (шкала логарифмическая). По оси ординат: а, б — поток Rb^+ , мкмоль на 1 г белка за 30 мин; в, г: слева — внутриклеточное содержание ионов, мкмоль на 1 г белка, справа — объем клетки, усл. ед., и доля клеток, находящихся в S-периоде, %. Приведены результаты двух опытов с «быстрой» (а, в) и «медленной» (б, г) бласттрансформацией. OS, OR — убавин-чувствительный и убавин-резистентный потоки соответственно. Линия, параллельная оси абсцисс, — начальное содержание K^+ .

калия, 3) снижение содержания натрия при крутом нарастании содержания калия, 4) увеличение содержания натрия на фоне снижения содержания калия. На 1-й стадии отношение K^+/Na^+ от исходного 5 снижается до 3, и это происходит главным образом за счет увеличения содержания натрия. Позднее отношение K^+/Na^+ увеличивается до 4.8, но происходит это уже в основном за счет увеличения содержания калия (табл. 1). Таким образом, различие между исходными и покоящимися лимфоцитами и вступающими в S-период бластами проявляется не в изменении отношения K^+/Na^+ , а в содержании этих катионов на 1 г белка.

Входной поток рубидия. Об интенсивности работы Na^+, K^+ -АТФазной системы активного транспорта натрия и калия можно судить по величине убаин-чувствительного компонента входного потока рубидия — физиологического аналога калия (Segel et al., 1976a, 1979), а о состоянии трактов, по которым калий перемещается за счет градиента электрохимического потенциала, — по убаин-резистентному компоненту. Оба компонента входного потока рубидия во время бласттрансформации претерпевают характерные изменения (рис. 1, 2). В интервале 0—30 мин, как правило, наблюдается увеличение потока рубидия через насос. Оно выражено тем сильнее, чем ниже исходная величина потока, и может совершенно отсутствовать, если поток велик. Чаще всего это бывает, когда в популяции лимфоцитов исходно содержится повышенное количество крупных клеток, т. е. как бы уже активированных (табл. 2). Какой-либо закономерности в вариации величины убаин-резистентного компонента входного потока рубидия от опыта к опыту и от донора к донору при этом не наблюдается.

Таблица 1
Изменение содержания K^+ , Na^+ и входного потока Rb^+ у лимфоцитов человека, активированных ФГА

Показатель	Значение показателя, $\bar{x} \pm \bar{s}_x$		
	без ФГА	на ранней стадии активации	на поздней стадии активации
K^+ , мкмоль/г	710 ± 36		
ΔK^+ , %		—17 ± 2 (0— $t_{\min}$)	53 ± 9 ($t_{\min}$ — $t_{\max}$)
Na^+ , мкмоль/г	158 ± 18		25 ± 7 (0— $t_{\max}$)
ΔNa^+ , %		14 ± 6 (0—0.5 ч) 33 ± 10 (0—2 ч) 51 ± 13 (0—5 ч) 3.0 ± 0.3 (2—5 ч)	44 ± 12 (0—24 ч)
Среднее отношение K^+/Na^+	5.0 ± 0.3		4.8 ± 0.5 ($t_{\max}$)
Убаин-чувствительный поток $M_{\text{ч}}$, мкмоль/г за 30 мин	22.0 ± 3.6		
$\Delta M_{\text{ч}}$, %		—3 ± 10 (0.5—2 ч) 10.0 ± 7.5 (2—5 ч)	203 ± 30 (0.5 ч— $t_{\max}$)
Убаин-резистентный поток $M_{\text{р}}$, мкмоль/г за 30 мин	14.0 ± 2.3		
$\Delta M_{\text{р}}$		—8.4 ± 7.2 (2—5 ч)	127 ± 33 (0.5 ч— $t_{\max}$)
Среднее отношение $M_{\text{ч}}/M_{\text{р}}$	1.60 ± 0.25	1.9 ± 0.8	2.8 ± 0.5 ($t_{\max}$)

Примечание. В скобках указан временной интервал, для которого приведена разность значений регистрируемых показателей. За 100% принято первое из этих значений. $t_{\min}$, $t_{\max}$ — время, соответствующее минимальному и максимальному значениям показателя соответственно.

Поскольку значения потоков, регистрируемые через 30 мин действия ФГА, стабильнее исходных, для оценки всех последующих изменений потоков удобно относить их к значению через 30 мин. Эти более поздние изменения обусловлены перестройками в разных системах переноса калия. Сначала имеет место относительно медленное увеличение и убаин-чувствительного, и убаин-резистентного потоков, продолжающееся примерно до 8, иногда до 16 ч. В этот период общий поток увеличивается примерно в 1.5 раза, и отношение потока

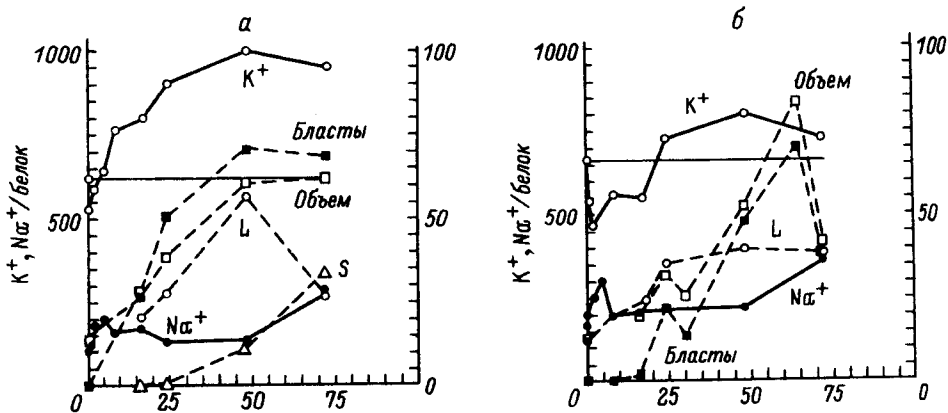


Рис. 2. Содержание K^+ и Na^+ , объем, доля клеток, находящихся в S-периоде, доля бластов и скорость синтеза белка на поздней стадии активации лимфоцитов.

По оси абсцисс — время культивирования, мин. По оси ординат: слева — содержание K^+ или Na^+ , мкмоль на 1 г белка; справа — доля клеток, находящихся в S-периоде, и доля бластов, %, скорость включения ^{14}C -лейцина в белок и объем, усл. ед. L — лейцин, S — S-период. Линия, параллельная оси абсцисс, — начальное содержание K^+ . а — опыт с «быстрой» бласттрансформацией, б — опыт с «медленной» бласттрансформацией (те же опыты, что и на рис. 1).

через насос к потоку через все другие тракты составляет 1.9—2.2. У контрольных «покоящихся» лимфоцитов оно равно 1.6. Позднее, с 8—16 ч, наблюдается более крутое увеличение потоков, и их отношение возрастает в среднем до 2.8. К 48 ч поток через насос увеличивается примерно в 3 раза по отношению к потоку через 30 мин и в 4 раза — по отношению к исходному значению. Следует иметь в виду, что речь здесь идет о величине потока в расчете на 1 г белка. Если учесть рост массы белка на поздних стадиях бласттрансформации и оценивать поток на клетку, общее увеличение потока оказывается весьма значительным. В конце исследованного нами временного интервала во многих случаях наблюдалось крутое снижение потоков, особенно убаин-чувствительного потока. Циклогексимид, введенный вместе с ФГА, снимал позднее увеличение потока рубидия и не изменял его в ранние сроки.

Таблица 2

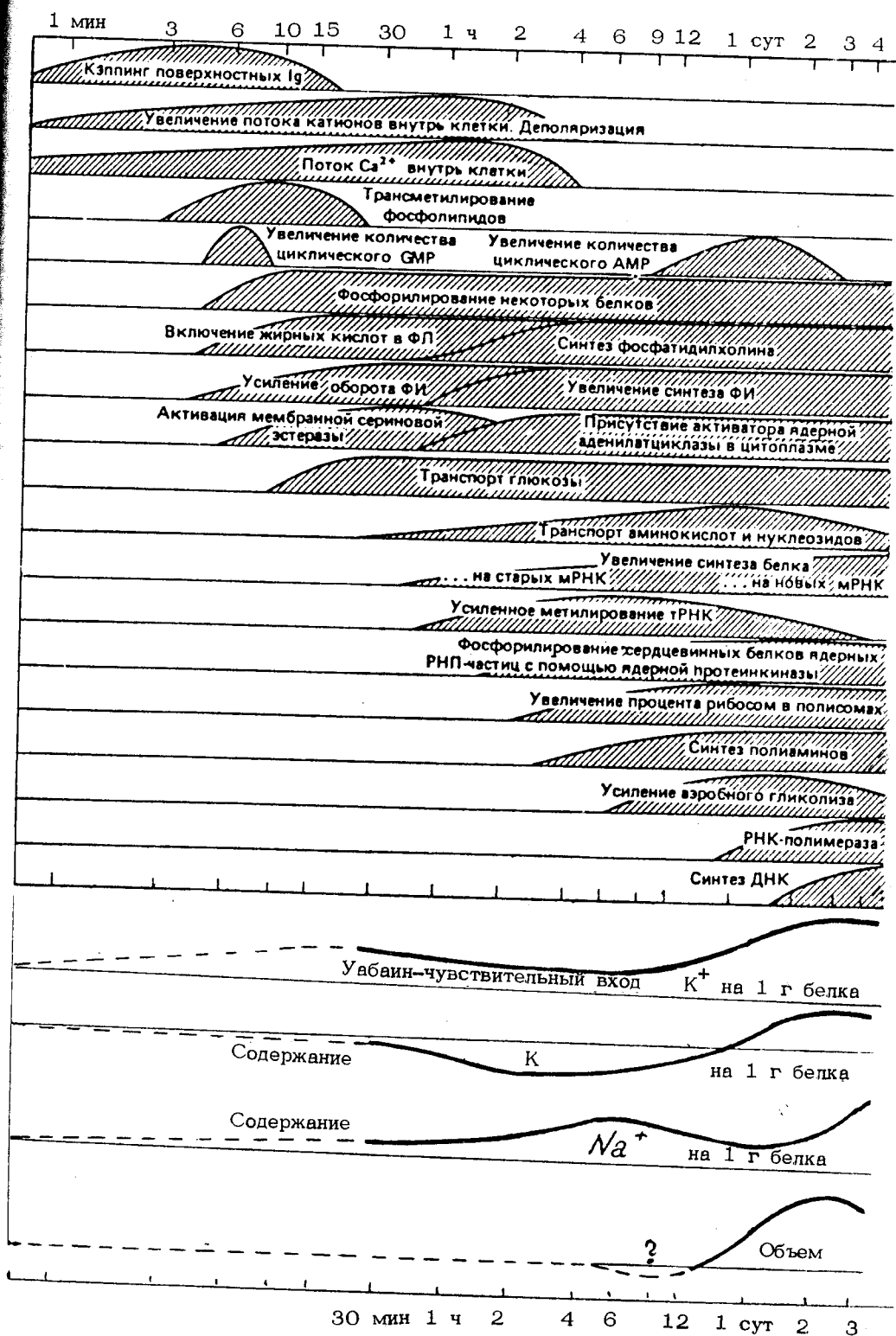
Изменение убаин-чувствительного и убаин-резистентного потоков Rb^+ в лимфоциты человека за первые 30 мин действия ФГА в зависимости от исходной величины потока и объема клеток

Общий исходный поток, мкмоль/г за 30 мин	Средний объем клетки, ^а усл. ед.	Изменение потока, % от его величины без ФГА	
		убаин-чувствительный поток	убаин-резистентный поток
17	57	+275	—22
23	49	+80	+38
44	49	+31	+60
31	69	—9	+56
49	93	—10	+28
50	96	0	0

^а Данные получены для фиксированных клеток.

Рис. 3. Распределение клеток по объему на разных стадиях бласттрансформации.

По оси абсцисс — объем, усл. ед.; по оси ординат — доля клеток соответствующего размерного класса, %. Распределения получены для тех же лимфоцитов, результаты регистрации других показателей, которые представлены на рис. 1, а. а. Каждое распределение — результат определения размеров 200 лимфоцитов.



Рост клеток. Динамика роста и пролиферации лимфоцитов периферической крови человека, активированных ФГА, исследовалась во многих работах (см. лит.: Ling, Kay, 1975; Эшмен, 1987). Однако большой разброс результатов от донора к донору и от опыта к опыту побудил нас провести соответствующие измерения во всех опытах, когда нужно было сопоставить «ионные» изменения с «ростовыми». Наиболее ранним признаком начала роста лимфоцитов среди измерявшихся нами показателей было увеличение скорости синтеза белка, оцениваемое по включению ^{14}C -лейцина. Увеличение скорости синтеза белка примерно в 1.5 раза в наших условиях отмечалось уже в 8-часовой пробе, тогда как увеличение размера клеток можно было заметить, как правило, не ранее следующей, 16-часовой, пробы (рис. 2). В интервале 48—72 ч скорость включения лейцина была в 4—6 раз выше, чем в контроле. Общая масса клеточного белка возрастала начиная с 16-часовой пробы, в которой количество белка увеличивалось примерно на 20%. К 48 ч оно возрастало примерно в 2 раза ($208 \pm 33\%$). Речь здесь идет о массовом синтезе клеточных белков. Известно, что в стимулированных ФГА лимфоцитах многие белки начинают синтезироваться гораздо раньше (Ferris et al., 1988; Haire, O'Leary, 1988). В «безлейциновой» среде увеличение скорости включения ^{14}C -лейцина можно заметить уже через 10 мин (Baliga et al., 1987).

Достаточно узкое исходное распределение лимфоцитов по размерам после активации становится более широким и асимметричным (рис. 3). На рис. 2 показано, как нарастает в популяции доля бластов, т. е. число клеток, размеры которых превышают максимальные размеры клеток до активации. Через 16 ч уже 25—30% клеток могут быть крупнее самых крупных в контроле. Через 48 ч бласты составляют в среднем 65% общего числа клеток, что близко к наблюдавшемуся другими исследователями (Bernheim et al., 1977, 1978; Brown et al., 1980). Число клеток, «начавших расти», в действительности могло быть и больше, поскольку если расти начинали клетки, имеющие минимальные размеры, за рассматриваемый отрезок времени их размеры могли не превысить исходных максимальных размеров клетки.

«Средний» объем клеток изменяется во времени примерно так же, как и число клеток, превышающих по размеру контрольные лимфоциты (рис. 2). В 48-часовой пробе объем лимфоцитов в 4.6 раза больше исходного. Таким образом, на 35% клеток, размеры которых не выходят за пределы размеров клеток исходной популяции, через 48 ч приходится 7% всего объема клеточной массы.

Параллельные определения объема клеток, содержания в них катионов и потока рубидия выявляют четкую корреляцию между изменением «ростовых» и «ионных» показателей. Крутое нарастание удельного содержания калия приходится на ту стадию бласттрансформации, когда наблюдается увеличение объема клеток. Это хорошо видно при сопоставлении кривых типа тех, что представлены на рис. 2. Уменьшение среднего объема клеток на 3-и сут, наблюдавшееся, в частности, в опыте, результаты которого приведены на рис. 2, б, по-видимому, связано с делением клеток. Оно не сопровождается снижением содержания калия, и этот результат не случаен. По имеющимся у нас данным, которые будут рассмотрены в специальной публикации, увеличение удельного содержания калия характерно для перехода клеток от покоя к пролиферации ($G_0 \rightarrow G_1$), а не для продвижения по циклу ($G_1 \rightarrow S$).

В табл. 3 приведены результаты 5 опытов, в которых бласттрансформация происходила особенно медленно. В этом случае выявляется тенденция к снижению объема клеток на начальной стадии активации, когда удельное содержание калия в клетках снижается. Уменьшение объема лимфоцитов периферической крови человека на ранней стадии активации их ФГА отмечали и другие исследователи (Holian et al., 1979).

Увеличение среднего объема клеток к 48 ч, оцениваемое по их размерам на фиксированных препаратах, примерно в 2 раза превосходит рост массы клеточного белка в расчете на пробу. Специальная проверка показала, что эта разница не связана с изменением размера клеток при фиксации. В ряде опытов было исследовано распределение по размеру живых клеток с помощью проточного цитометра (Гусев и др.,

1991). Оказалось, что и по этим измерениям объем лимфоцитов к 48 ч увеличивается в среднем в 3.4 раза. Изменение соотношения объем/белок в самих клетках тоже не может объяснить разницу в росте белка и объема, так как при изменении плотности от 1.072 у покоящихся лимфоцитов до 1.064 у 24-часовых бластов (Loos, Roos, 1974) изменение содержания воды не может быть большим и по расчету составляет примерно 15%. Одной из возможных причин может быть разрушение части клеток. Уменьшение числа клеток в течение первых 2 сут в культуре лимфоцитов, активированных ФГА, в условиях, аналогичных нашим, наблюдали и другие исследователи (Bernheim et al., 1978; Mendelsohn et al., 1981, 1982).

Репликация ДНК. По данным проточной ДНК-цитометрии, доля лимфоцитов, находящихся в S-периоде, после стимуляции начинала нарастать

Таблица 3

Динамика изменения объема клеток в опытах с замедленной бласттрансформацией

Дата опыта	Объем клеток (v , $\mu\text{км}^3$) и его изменение (Δ , %) в зависимости от времени активации (ч)									
	0		8		16		24		48	
	v	v	Δ	v	Δ	v	Δ	v	Δ	
5.04.90	216	230	+6	220	+2	195	—10	734	240	
4.06.90	220	180	—18	236	+7	252	+15	270	23	
11.01.91	239	217	—9	240	+0.5	224	—6	385	61	
15.01.91	253	210	—16	230	—9	230	—9	420	66	
6.02.91	208	163	—22	193	—7	281	+35	460	121	
$\bar{x} \pm s_x$	227 ± 8	200 ± 12	-12 ± 5	223 ± 8	1.3 ± 3.0	236 ± 14	5 ± 8	454 ± 77	102 ± 38	

Примечание. Средний объем клеток рассчитан по данным о распределении клеток по размеру, полученным для живых клеток с помощью проточной фотометрической установки (Гусев и др., 1991).

относительно поздно — только через 24 ч или даже позднее. Через 48—72 ч, как правило, около 30% клеток находилось в S-периоде и около 10% — в G₂-периоде. В исходной популяции лимфоцитов одного из доноров было зарегистрировано около 1% клеток в S-периоде. Существенное нарастание числа клеток в S-периоде в этом опыте все равно началось не ранее 24 ч. Скорость синтеза ДНК, оцениваемая по включению ³H-тимидина, как правило, нарастает начиная с 24 ч и достигает максимума в интервале 48—72 ч, что соответствует результатам, полученным Майзелем с соавторами (Maizel et al., 1981). Таким образом, и ДНК-цитометрия, и определение скорости включения ³H-тимидина показывают, что увеличение содержания калия в лимфоцитах происходит до начала репликации ДНК.

Обсуждение

Одна из наиболее полных сводных схем развития во времени основных процессов, сопровождающих активацию и бласттрансформацию лимфоцитов, дана Эшменом (1987). Она охватывает временной интервал с 1-х мин до 4 сут и включает в себя около 20 показателей, главным образом биохимических, но также и некоторые физиологические (рис. 4). В настоящее время эта схема могла бы быть существенно расширена введением данных по экспрессии отдельных генов (Crabtree, 1989). Показано, что не менее 60 новых мРНК появляется в лимфоцитах периферической крови

человека, активированных ФГА, в течение первых 4—5 ч (Zipfel et al., 1989). Для многих генов показана динамика изменения экспрессии в широком временном разрезе. К числу наиболее изученных относятся гены *c-myc*, *c-fos*, *c-myc*, *II-2R*, *II-2*, *TFR* (Krönke et al., 1985; Leonard et al., 1985; Greene, 1986; Reed et al., 1986; Kumagai et al., 1987, 1988; Deguchi et al., 1988; Farrar et al., 1988; Granelli-Piperna, 1988; Lindstein et al., 1988; Irving et al., 1989; Jordan et al., 1989).

По моновалентным катионам в схеме Эшмена имеются данные только для первых 2—3 ч. Далее следует пробел. Действительно, внимание предшествующих исследователей было привлечено в основном к измерению ионных потоков, преимущественно входного потока калия или его физиологического аналога рубидия в течение первых 1—2 ч после активации лимфоцитов. В работах до 1975 г. при анализе внутриклеточного содержания катионов осадок лимфоцитов обычно ресуспендировали. Позднее выяснилось, что разбивание клеточных агрегатов, образующихся при активации, ведет к повреждению лимфоцитов и потере внутриклеточного калия (Segel et al., 1975, 1976b). В связи с этим результаты, полученные до 1975 г., считаются ненадежными (библиография этих работ приведена в обзоре Каплана (Kaplan, 1978)). Более поздние работы сходятся в том, что потоки калия — как входной, так и выходной — у активированных лимфоцитов периферической крови человека увеличиваются в 1.5—2 раза (см. сводку: Lauf, 1978). Внутриклеточное содержание калия в расчете на клетку, по данным Сигела и соавторов (Segel et al., 1976b), на протяжении первых 24 ч сохраняется постоянным. К выводу о постоянстве содержания калия в лимфоцитах человека, активированных ФГА, в течение первых 2 ч пришли Холиан и соавторы (Holian et al., 1979). Эти исследователи наблюдали уменьшение объема лимфоцитов и соответственно возрастание концентрации калия в расчете на внутриклеточную воду на 29% через 1 ч после активации лимфоцитов ФГА. Имеются сообщения о снижении содержания калия в лимфоцитах человека, активированных конканавалином А, на 16% к 4 ч, когда лимфоциты отделялись от среды фильтрацией через дибутилфталат, и потерь калия, связанных с ресуспендированием клеток, по мнению авторов, не было (Negendank, Collier, 1976). Снижение содержания калия у лимфоцитов человека при действии ФГА наблюдал Авердунк (Averdunk, 1976). По данным, полученным в нашей лаборатории Ежевском, у лимфоцитов человека, активированных ФГА, в интервале 1—3 сут удельное содержание калия увеличивается с 510—600 до 820—1000 мкмоль на 1 г белка, а входной поток рубидия возрастает в 6 раз в расчете на 1 г белка, или в 20 раз в расчете на клетку (Ежевский и др., 1988).

Сопоставляя полученные в настоящей работе данные с результатами, полученными другими авторами, необходимо прежде всего отметить большую вариабельность динамики активации лимфоцитов от опыта к опыту и от донора к донору. Каковы бы ни были причины этой вариабельности, ясно, что сравнительный анализ изменения разных показателей можно проводить только по данным, полученным в одном опыте. Соответственно сравнивать результаты, полученные разными исследователями, можно только в том случае, если они даны в достаточно широком временном разрезе.

По нашим данным, содержание калия в лимфоцитах человека, активированных ФГА, сначала снижается, затем возвращается к исходному уровню и вслед за тем поднимается выше исходного уровня, превышая его примерно в 1.3 раза, если иметь в виду удельное содержание калия на 1 г белка, и в 4—6 раз в расчете на клетку, размеры которой со временем увеличиваются. Сигел и соавторы (Segel et al., 1976b) исследовали содержание калия на клетку у лимфоцитов периферической крови человека, активированных ФГА и конканавалином А, в течение первых суток и пришли к заключению, что уровень содержания калия сохраняется постоянным, если анализ клеток проводится без ресуспендирования осадка и разрушения клеточных агрегатов. В наших опытах отмывка клеток от среды, содержащей калий и натрий, проводилась без ресуспендирования осадка,

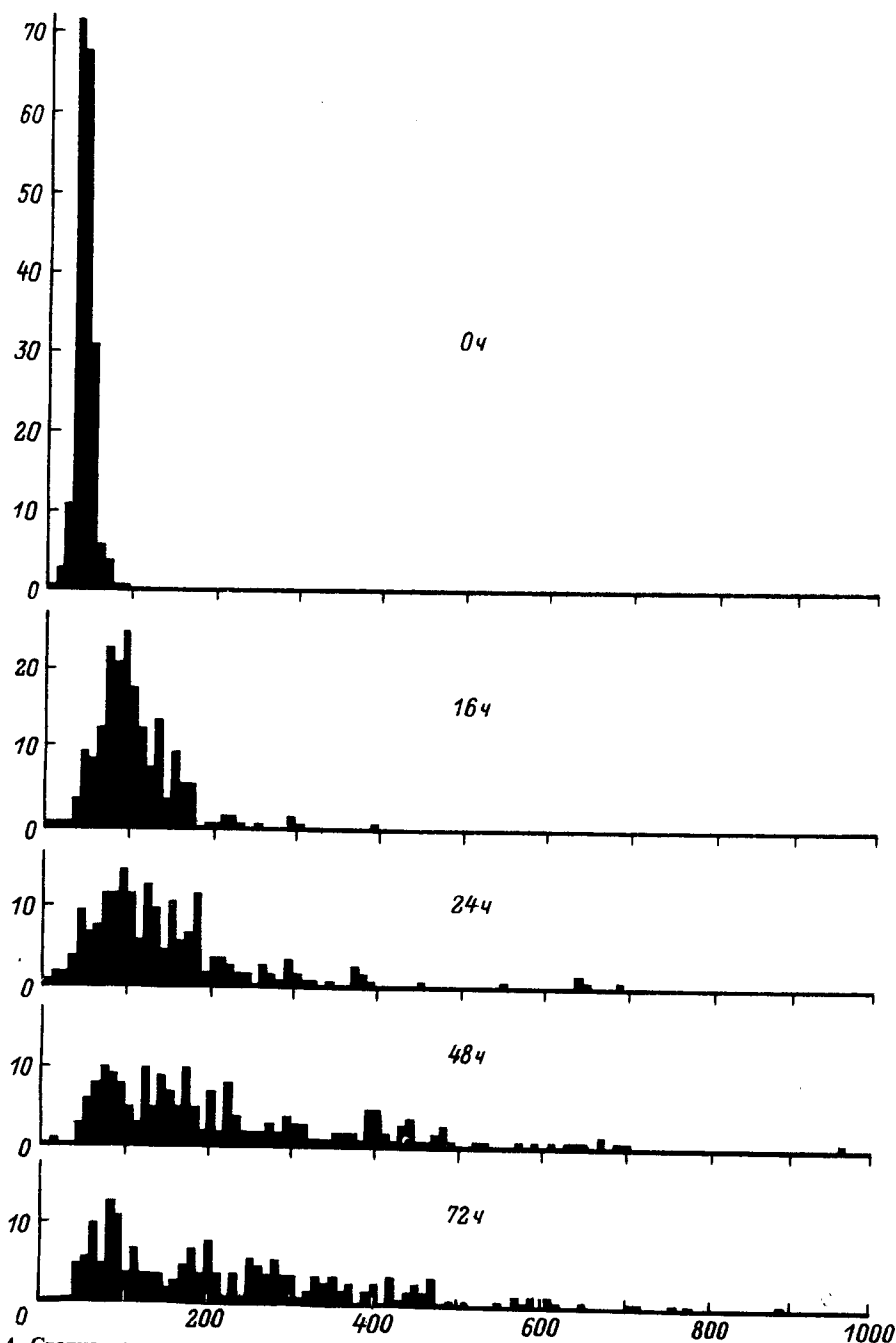


Рис. 4. Сводная схема разворачивания во времени физиологических и биохимических процессов при активации Т-лимфоцитов митогенами.

По: Эшмен (1987) с дополнениями (4 нижних графика — по данным настоящей работы).

и нет оснований говорить о потере калия, связанной с повреждением клеток. Тем не менее мы наблюдали достаточно четкое снижение содержания калия на первых стадиях активации. Мы полагаем, что и снижение содержания калия, наблюдавшееся некоторыми из наших предшественников, далеко не всегда было вызвано повреждением клеток (Kaplan, 1978).

Возрастание содержания калия в лимфоцитах после первых суток активации, возможно, не попадало в поле зрения предшествующих исследователей или попадало, но не обсуждалось, потому что определялось содержание калия на клетку или клеточную воду. В первом случае увеличение содержания калия в период, когда лимфоциты начинают расти, могло казаться связанным только с ростом клеток и потому неинтересным. Во втором случае, т. е. при расчете содержания калия на внутриклеточную воду, изменения на поздней стадии активации могли быть незамеченными, из-за того что изменения концентрации катионов в расчете на внутриклеточную воду, когда содержание воды изменяется, всегда меньше изменения удельного содержания катионов в расчете на сухую массу клетки. В нашей работе оценивали содержание катионов в расчете на 1 г клеточного белка. В этом случае могут выявляться специфические изменения содержания калия и исключаются эффекты, связанные с изменением размера клеток.

Сопоставление динамики изменения удельного содержания калия с изменениями размеров лимфоцитов, скоростью синтеза белка и ДНК показывает, что увеличение удельного содержания калия существенно опережает репликацию ДНК и приходится на ту стадию, когда начинается рост клеток. Корреляция между содержанием калия в клетках и интенсивностью пролиферации, оцениваемая по доле клеток в S-периоде, установленная в работе Ежевского и соавторов (1988), очевидно, есть результат определенной взаимосвязи между «циклом роста» и «циклом репликации ДНК» (Baserga, 1984, 1985). При сравнении динамики активации лимфоцитов в разных опытах хорошо прослеживается связь «ростовых» и «ионных» показателей.

Из полученных данных следует, что ионные изменения при активации лимфоцитов многообразны и механизмы их различны. При анализе причин ранних изменений ингибируемого убаином потока калия необходимо иметь в виду результаты, полученные Капланом и его коллегами (Kaplan, Owens, 1980; Prasad et al., 1987; Severini et al., 1987) на лимфоцитах свиньи, активированных конканавалином А, которые показывают, что увеличение потока калия, наблюдаемое с 1-х мин до 3 ч, не связано с увеличением числа мест связывания убаина, т. е. числа Na, K-ATФазных единиц. В этом случае поток увеличивается либо за счет возрастания внутриклеточной концентрации натрия, либо за счет изменения состояния Na, K-ATФазы под действием физиологических регуляторов. К 5 ч Na, K-ATФазных единиц, по данным Каплана и соавторов, возрастало на 70%, но не за счет белкового синтеза, так как эффект не подавлялся циклогексимидом. Авторы цитированной работы полагают, что в этом случае имеет место переход в активное состояние прежде неактивной, «резервной» Na, K-ATФазы . Этот механизм аналогичен предлагавшемуся для объяснения резкого усиления транспорта глюкозы у лимфоцитов человека, активированных ФГА в 1-часовом диапазоне (Jacobs et al., 1989). Описанное нами позднее увеличение убаин-чувствительного входного потока рубидия и удельного содержания калия, связанное с ростом лимфоцитов, снимается циклогексимидом и, очевидно, иного типа. На каком уровне совершается регуляция ионного транспорта — на уровне транскрипции, процессинга-деградации мРНК или на уровне синтеза транспортного белка, — в данном случае сказать трудно. Как отмечалось выше, активация лимфоцитов сопровождается появлением множества новых мРНК (Zipfel et al., 1989). Интересно было бы выяснить, изменяется ли при этом уровень мРНК Na, K-ATФазы . Соответствующие ДНК-зонды для обнаружения этой мРНК в настоящее время имеются, и известны случаи «функциональной» регуляции экспрессии мРНК Na, K-ATФазы (Pressley, 1988; Broude et al., 1989; Váradí et al., 1989; Dhir et al., 1990; Логвиненко и др., 1991). Предпринятые нами попытки провести такое исследование на лимфоцитах пока не дали четкого результата. Отметим, что изменение транспорта глюкозы у клеток 3Т3, активированных некоторыми ростовыми факторами, сопровождается изменением уровня мРНК глюкозного транспортера (Kitagawa et al., 1989).

Как показывают наши измерения потока рубидия, позднее увеличение удельного содержания калия сопряжено с 4-кратным (в расчете на 1 г белка) увеличением потока катионов через Na,K-АТФазный насос. Убаин-резистентный поток рубидия, т. е. поток по градиенту электрохимического потенциала через другие тракты, при этом тоже возрастает, но слабее примерно в 2 раза. Отношение потока рубидия через насос к потоку по остальным трактам вследствие этого увеличивается с 1.6 у исходных покоящихся лимфоцитов до 2.8 у 24—48-часовых лимфобластов.

Значительная часть убаин-резистентного потока у лимфоцитов человека приходится на калиевые каналы (Cahalan et al., 1985; Cahalan, Lewis, 1988; Deutsch, Lee, 1989; Grinstein, Dixon, 1989). Для лимфоцитов мыши, активированных конканавалином А, показано, что бласттрансформация сопровождается резким (более чем на порядок) увеличением максимальной калиевой проводимости мембраны как в расчете на клетку, так и в расчете на единицу поверхности лимфоцита, что указывает на появление новых каналов и увеличение их концентрации в мембране (DeCoursey et al., 1987a, 1987b). Однако в параллельных исследованиях лимфоцитов человека авторы цитированной работы нашли относительно небольшое (в 1.7 раза) увеличение максимальной калиевой проводимости при бласттрансформации, вызванной аллогенными лимфоцитами и форболовым эфиром, причем концентрация каналов в мембране при этом не возрастала (сходные результаты см.: Deutsch et al., 1986). При активации же лимфоцитов человека ФГА было обнаружено не увеличение, а уменьшение максимальной калиевой проводимости на стадии бласттрансформации.

При сопоставлении этих результатов с наблюдавшимся нами увеличением убаин-резистентного потока рубидия следует иметь в виду, что максимальная калиевая проводимость — это суммарная проводимость калиевых каналов в условиях, когда все каналы открыты. Между тем в нормальных физиологических условиях значительная часть каналов может находиться в закрытом состоянии. Изменение соотношения между числом открытых и закрытых каналов — один из основных механизмов регуляции калиевой проводимости, который клетки широко используют в самых разнообразных физиологических процессах. Имеются указания на то, что быстрее, «раннее» увеличение потока калия при действии на лимфоциты человека ФГА обусловлено именно изменением числа открытых калиевых каналов (DeCoursey et al., 1984, 1985; Cahalan et al., 1985). Наблюдавшееся нами увеличение убаин-резистентного потока рубидия при бласттрансформации лимфоцитов человека ФГА в свете электрофизиологических данных указывает на то, что бласттрансформация сопровождается увеличением числа открытых каналов.

Для того чтобы понять, как связано изменение потоков с изменением содержания ионов в клетке и концентрацией их во внутриклеточной воде, необходимо обратиться к общей схеме движения и распределения моновалентных ионов в животных клетках. В настоящее время возможен расчет стационарных концентраций калия, натрия и хлора в клетке, мембрана которой содержит транспортеры всех типов, и можно предсказать, как должно изменяться содержание этих ионов на единицу осмотической активности внутриклеточного материала, а также содержание воды и мембранный потенциал, если известно, как изменены кинетические параметры, характеризующие работу мембранных транспортеров, и суммарный электрический заряд внутриклеточных осмотиков, т. е. тех внутриклеточных компонентов, которые не могут свободно перераспределяться между цитоплазмой и средой (Jacobsson, 1980; Веренинов, Марахова, 1986). Можно решать и обратную задачу, а именно выяснять, с изменением каких параметров связаны сдвиги во внутриклеточном содержании ионов воды и мембранного потенциала. Детальное рассмотрение этих вопросов применительно к ионным изменениям, сопровождающим бласттрансформацию лимфоцитов, выходит за рамки настоящей статьи и будет предметом специальной публикации. Здесь необходимо отметить лишь некоторые ключевые моменты и выводы, к которым мы пришли, используя модель распределения ионов в животных клетках, описанную ранее (Веренинов, Марахова, 1986).

У клеток типа лимфоцитов, т. е. клеток с мембранным потенциалом в несколько десятков милливольт и отношением K^+/Na^+ больше единицы (2—5), к увеличению содержания калия на единицу суммарной осмотической активности внутриклеточных компонентов, не проникающих через мембрану, могут приводить следующие причины. 1. Увеличение электрического заряда не проникающих через мембрану внутриклеточных компонентов в расчете на единицу осмотической активности этих компонентов. При этом увеличение содержания калия должно сопровождаться увеличением содержания натрия и воды и увеличением концентрации калия в расчете на внутриклеточную воду. 2. Увеличение константы скорости переноса калия и натрия через Na, K -АТФазный тракт (константа скорости переноса может быть определена как отношение потока катионов по этому тракту к их концентрации с той стороны мембраны, откуда идут эти ионы). В этом случае увеличение содержания калия в расчете на единицу внутриклеточных осмотиков должно сопровождаться, наоборот, снижением содержания натрия, уменьшением суммарного содержания калия и натрия и содержания воды. К аналогичному разнонаправленному изменению содержания калия и натрия приводят уменьшение скорости переноса натрия по градиенту электрохимического потенциала, которое может быть связано с закрытием натриевых каналов, или уменьшением константы переноса натрия через системы сопряженного транспорта натрия, а также уменьшение скорости переноса калия по градиенту электрохимического потенциала, с той лишь разницей, что в последнем случае суммарное содержание катионов и объем клетки возрастают.

Другие возможности, связанные, в частности, с изменением переноса через мембрану ионов хлора и интенсивностью системы четверного симпорта $K^+ + Na^+ + 2Cl^-$, мы не рассматриваем, так как потоки через систему симпорта в лимфоидных клетках малы, а данные по изменению транспорта хлора у лимфоцитов, активированных ФГА, еще слишком скудны.

Полученные экспериментальные данные показывают, что в зависимости от стадии бласттрансформации могут иметь место как однонаправленные так и разнонаправленные изменения в содержании калия и натрия, а это значит, что изменения, относящиеся к разным стадиям активации лимфоцитов, имеют различную природу. Каков механизм наиболее интересного для нас здесь возрастания удельного содержания калия, приходящегося на стадию начала роста клеток? Увеличение потока калия и натрия по Na, K -АТФазному тракту не может приводить к одновременному увеличению содержания и калия, и натрия. В период таких изменений причину нужно искать в увеличении электрического заряда, приходящегося на единицу суммарной осмотической активности внутриклеточных компонентов, или, выходя за рамки рассматриваемой модели, в том, что найденное в опыте изменение содержания катионов не эквивалентно изменению их содержания в расчете на единицу осмотической активности внутриклеточного материала.

Более позднее увеличение содержания калия, сопровождающееся снижением содержания натрия, по крайней мере качественно, может быть объяснено возрастанием скорости переноса катионов по Na, K -АТФазному тракту, и с этим хорошо увязываются наблюдаемые в опыте увеличение убаин-чувствительного потока рубидия и увеличение отношения убаин-чувствительного потока к убаин-резистентному. Необходимо, однако, иметь в виду, что увеличение отношения скорости переноса калия через насос к скорости переноса этого катиона по электрохимическому градиенту, по расчету, должно сопровождаться уменьшением суммарного содержания калия и натрия и содержания воды. В действительности «позднее» увеличение содержания калия сопровождается помимо увеличения отношения K^+/Na^+ увеличением суммарного содержания калия и натрия. Таким образом, и на этой стадии значительную роль в наблюдаемых изменениях транспорта и распределения моновалентных катионов должны играть доннановские факторы, а именно осмотическая активность и заряд сухого вещества клетки.

Каков мог бы быть функциональный смысл увеличения содержания калия и натрия в клетке? Из условия водно-осмотического баланса следует, что увеличение

суммарного содержания калия и натрия всегда сопряжено с увеличением содержания в клетке воды. Достаточно очевидно, что рост клеток и увеличение их объема невозможны без своевременной подачи в клетку ионов. Связанный с этим функциональный смысл наблюдаемого увеличения содержания моновалентных катионов «в расчете на клетку» достаточно банален и не требует пояснений. Однако при простой, «пропорциональной», мультипликации всех компонентов в процессе роста клетки и пропорциональном увеличении содержания ионов, содержания воды и сухой массы клетки мы не могли бы наблюдать увеличение удельного содержания ионов, т. е. их содержание в расчете на единицу сухой массы клетки. Вряд ли можно сомневаться в том, что увеличение удельного содержания катионов сопряжено с увеличением содержания воды в расчете на единицу сухой массы клетки и снижением плотности последней, хотя прямыми данными о связи наблюдаемых ионных изменений и плотности клеток мы пока не располагаем. По литературным данным, бласттрансформация лимфоцитов человека сопровождается уменьшением их плотности от 1.072 у покоящихся до 1.064 у бластов (Loos, Roos, 1974). В покоящихся лимфоцитах около 70% сухой массы приходится на белки (средняя плотность 1.27) и 10% — на ДНК (Cline, 1975) (плотность 1.7). Если принять, что плотность сухого вещества лимфоцитов в процессе бласттрансформации не изменяется, то изменение содержания воды составляет около 15%. Из-за увеличения содержания в лимфобластах воды изменение внутриклеточной концентрации калия в расчете на внутриклеточную воду меньше изменения содержания калия в расчете на единицу сухой массы клетки и может быть не обнаружено. В этом одна из причин разноречивости результатов предыдущих исследователей, которые определяли концентрацию калия в расчете на внутриклеточную воду или сырую массу клетки. Другой, более общий вывод состоит в том, что изменение концентрации калия во внутриклеточной воде, сопряженное с ростом клеток, слишком мало, чтобы иметь какое-то функциональное значение в процессах, где калий участвует как лиганд. Вопрос о том, есть ли какой-то иной смысл в увеличении удельного содержания калия при переходе клеток от покоя к пролиферации, в настоящее время остается открытым. Мы констатируем, однако, что в случае перехода к пролиферации лимфоцитов периферической крови человека имеет место та же закономерность, которая была установлена ранее для пролиферирующих клеток постоянных линий (Веренинов, Марахова, 1986). Мы полагаем, что высокое удельное содержание калия на единицу сухой массы клетки является характерным признаком того, что клетки готовятся к пролиферации.

Список литературы

- Веренинов А. А., *ст.*, Веренинов А. А., *мл.* Ионный, электрический и водный баланс в животной клетке. Система с активным транспортом катионов, Гольдмановскими каналами и симпортом типа $\text{Na} + \text{K} + 2\text{Cl}$ // Цитология. 1991. Т. 33, № 11. С. 4—17.
- Веренинов А. А., Виноградова Т. А., Ивахнюк И. С., Марахова И. И., Торопова Ф. В. Применение пламенно-эмиссионного анализа для измерения потоков щелочных катионов через клеточную мембрану // Цитология. 1982. Т. 24. № 1. С. 98—103.
- Веренинов А. А., Марахова И. И. Транспорт ионов у клеток в культуре. Л.: Наука, 1986. 292 с.
- Гуковская А. С. Роль ионов в активации лимфоцитов // Успехи соврем. биол. 1984. Т. 97. № 1. С. 179—192.
- Гусев Е. В., Месропян Э. А., Розанов Ю. М., Ованесян А. Г. Автоматический гранулометрический счетчик слабоконтрастных микрочастиц (АОД-101) // Лаб. дело. 1991. № 5. С. 12—15.
- Ежевский С. А., Виноградов А. Е., Каждан И. Я., Цвейбах А. С. Изменение содержания калия, натрия и входных потоков калия в лимфоцитах периферической крови человека при длительном культивировании с фитогемагглютинином // Цитология. 1988. Т. 30, № 5. С. 573—581.
- Логвиненко Н. С., Хлебодарова Т. М., Соленов Е. И., Иванова Л. Н., Броуде Н. Е., Монастырская Г. С. Гормональная регуляция экспрессии мРНК Na^+, K^+ -АТФазы в почках крыс в постнатальном онтогенезе // Цитология. 1991. Т. 33, № 11. С. 18—25.
- Марахова И. И., Виноградова Т. А., Ефимова Е. В. Транспорт и содержание катионов в клетках СНО-773, стимулированных сывороткой. II. Поздние изменения входного потока рубидия и внутриклеточного содержания калия // Цитология. 1987. Т. 29, № 2. С. 202—207.
- Розанов Ю. М. Проточная цитометрия // Методы культивирования клеток. Л.: Наука, 1988. С. 136—147.
- Эшмен Р. Ф. Активация лимфоцитов // Иммунология. Т. 1. М.: Мир, 1987. С. 414—469.

- Averdunk R. Early changes of «leak flux» and the cation content of lymphocytes by concanavalin A // *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 1976. Vol. 70. P. 101—109.
- Baliga B. S., Sindel L. J., Jenkins L. D., Rashatwar S., Artman M. Inhibition of T-lymphocyte activation by amiloride // *J. Cell Biochem.* 1987. Vol. 33. P. 151—160.
- Baserga R. Growth in size and cell DNA replication // *Exp. Cell Res.* 1984. Vol. 151. P. 1—5.
- Baserga R. The biology of cell reproduction. Cambridge (Mass.): Harvard Univ. Press, 1985. 251 p.
- Bernheim J. L., Dorian R. E., Mendelsohn J. DNA synthesis and proliferation of human lymphocytes in vitro. I. Cell kinetics of response to phytohemagglutinin // *J. Immunol.* 1978. Vol. 120. P. 955—962.
- Bernheim J. L., Mendelsohn J., Kelley M. F., Dorian R. E. Kinetics of cell death and desintegration in human lymphocytes cultures // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1977. Vol. 74. P. 2536—2540.
- Böyum A. Separation of leucocytes from blood and bone marrow // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1968. Vol. 21, suppl. 97. P. 9—29.
- Broude N. E., Modyanov N. N., Monastyrskaya G. S., Sverdlov E. D. Advances in Na^+ , K^+ -ATPase studies: from protein to gene and back to protein // *FEBS Lett* 1989. Vol. 257. P. 1—9.
- Brown R. A., Gibbs J. H., Robertson A. J., Potts R. C., Beck J. S. Development of asynchrony in growth of normal human lymphocytes during first day of culture after PHA stimulation // *Exp. Cell Res.* 1980. Vol. 126. P. 87—97.
- Cahalan M. D., Chandy K. G., DeCoursey T. E., Gupta S. A voltage-gated potassium channel in human T lymphocytes // *J. Physiol.* 1985. Vol. 358. P. 197—237.
- Cahalan M. D., Lewis R. S. Role of potassium and chloride channels in volume regulation by T lymphocytes // *J. Gen. Physiol.* 1988. Symp. Vol. 43. P. 281—301.
- Cline M. J. The white cell. Cambridge (Mass.): Harvard Univ. Press, 1975. 564 p.
- Crabtree G. R. Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation // *Science.* 1989. Vol. 243. P. 355—361.
- DeCoursey T. E., Chandy K. G., Gupta S., Cahalan M. D. Voltage-gated K^+ channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis? // *Nature.* 1984. Vol. 307. P. 465—468.
- DeCoursey T. E., Chandy K. G., Gupta S., Cahalan M. D. Voltage-dependent ion channels in T-lymphocytes // *J. Neuroimmunol.* 1985. Vol. 10. P. 71—95.
- DeCoursey T. E., Chandy K. G., Gupta S., Cahalan M. D. Two types of potassium channels in murine T lymphocytes // *J. Gen. Physiol.* 1987a. Vol. 89. P. 379—404.
- DeCoursey T. E., Chandy K. G., Gupta S., Cahalan M. D. Mitogen induction of ion channels in murine T lymphocytes // *J. Gen. Physiol.* 1987b. Vol. 89. P. 405—420.
- Deguchi Y., Negoro S., Hara H., Nishio S., Kishimoto S. Age-related changes of proliferative response, kinetics of expression of protooncogenes after the mitogenic stimulation and methylation level of the protooncogene in purified human lymphocyte subsets // *Mech. Ageing Develop.* 1988. Vol. 44. P. 153—168.
- Deutsch C. J., Krause D., Lee S. C. Voltage-gated potassium conductance in human T lymphocytes stimulated with phorbol ester // *J. Physiol.* 1986. Vol. 372. P. 405—423.
- Deutsch C. J., Lee S. C. Modulation of K^+ currents in human lymphocytes by pH // *J. Physiol.* 1989. Vol. 413. P. 399—413.
- Dhir R., Nishioka Y., Blostein R. Na,K-ATPase isoform expression in sheep red blood cell precursors // *Biochim. Biophys. Acta.* 1990. Vol. 1026. P. 141—146.
- Farrar W. L., Harel-Bellan A., Ferris D. K. Biochemical and molecular events controlled by lymphokine growth factors // *J. Gen. Physiol.* 1988. Symp. Vol. 43. P. 371—380.
- Ferris D. K., Harel-Bellan A., Morimoto R., Welch W., Farrar W. L. Mitogen and lymphokine stimulation of heat shock proteins in T lymphocytes // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1988. Vol. 85. P. 3850—3854.
- Graneli-Piperno A. In situ hybridization for interleukin 2 and interleukin 2 receptor mRNA in T cells activated in the presence or absence of cyclosporin A // *J. Exp. Med.* 1988. Vol. 168. P. 1649—1658.
- Greene W. C. The human interleukin-2 receptor // *Ann. Rev. Immunol.* 1986. Vol. 4. P. 69—95.
- Grinstein S., Dixon S. J. Ion transport, membrane potential, and cytoplasmic pH in lymphocytes: changes during activation // *Physiol. Rev.* 1989. Vol. 69. P. 417—481.
- Hadden J. W. Transmembrane signals in the activation of T-lymphocytes by lectin mitogens // *Mol. Immunol.* 1988. Vol. 25. P. 1105—1112.
- Haire R. N., O'Leary J. J. Mitogen-induced preferential synthesis of protein during the G_0 to S phase transition in human lymphocytes // *Exp. Cell Res.* 1988. Vol. 179. P. 65—78.
- Holian A., Deutsch C. J., Holian S. K., Daniele R. P., Wilson D. F. Lymphocyte response to phytohemagglutinin: intracellular volume and intracellular $[\text{K}^+]$ // *J. Cell. Physiol.* 1979. Vol. 98. P. 137—144.
- Irving S. G., June C. H., Zipfel P. F., Siebenlist U., Kelly K. Mitogen-induced genes are subject to multiple pathways of regulation in the initial stages of T-cell activation // *Mol. Cell. Biol.* 1989. Vol. 9. P. 1034—1040.
- Jacobs D. B., Lee T.-P., Jung C. Y., Mookerjee B. K. Mechanism of mitogen-induced stimulation of glucose transport in human peripheral blood mononuclear cells // *J. Clin. Invest.* 1989. Vol. 83. P. 437—443.
- Jakobsson E. Interactions of cell volume, membrane potential, and membrane transport parameters // *Amer. J. Physiol.* 1980. Vol. 238. P. C196—C206.
- Jordan S. C., Toyoda M., Prehn J., Lemire J. M., Sakai R., Adams J. S. 1,25-Dihydroxyvitamin- D_3 regulation of interleukin-2 and interleukin-2 receptor levels and gene expression in human T cells // *Mol. Immunol.* 1989. Vol. 26. P. 979—984.
- Kaplan J. G. Membrane cation transport and the control of proliferation of mammalian cells // *Ann. Rev. Physiol.* 1978. Vol. 40. P. 19—41.
- Kaplan J. G., Owens T. Activation of lymphocytes of man and mouse: monovalent cation fluxes // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1980. Vol. 339. P. 191—200.
- Kitagawa T., Tanaka M., Akamatsu Y. Regulation of glucose transport activity and expression of glucose transporter mRNA by serum, growth factors and phorbol ester in quiescent mouse fibroblasts // *Biochim. Biophys. Acta.* 1989. Vol. 980. P. 100—108.

Krönke M., Leonard W. J., Depper J. M., Greene W. C. Sequential expression of genes involved in human T lymphocyte growth and differentiation // *J. Exp. Med.* 1985. Vol. 162. P. 1593—1598.

Kumagai N., Benedict S. H., Mills G. B., Gelfand E. W. Requirements for the simultaneous presence of phorbol esters and calcium ionophores in the expression of human T lymphocyte proliferation-related genes // *J. Immunol.* 1987. Vol. 139. P. 1393—1399.

Kumagai N., Benedict S. H., Mills G. B., Gelfand E. W. Comparison of phorbol ester/calcium ionophore and phytohemagglutinin-induced signaling in human T lymphocytes // *J. Immunol.* 1988. Vol. 140. P. 37—43.

Lauf P. K. Membrane immunological reactions and transport // *Membrane transport in biology*. Berlin; New York: Springer, 1978. Vol. 1. P. 291—348.

Leonard W. J., Krönke M., Pfeffer N. J., Depper J. M., Greene W. C. Interleukin 2 receptor gene expression in normal human T lymphocytes // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1985. Vol. 82. P. 6281—6285.

Lindsten T., June C. H., Thompson C. B. Multiple mechanisms regulate c-myc gene expression during normal T cell activation // *EMBO J.* 1988. Vol. 7. P. 2787—2794.

Ling N. R., Kay J. E. Lymphocyte stimulation. Amsterdam: North Holland Publ., 1975. 398 p.

Loos J. A., Roos D. Isopycnic centrifugation of antigen-activated human blood lymphocytes in the early phase of in vitro stimulation // *Exp. Cell. Res.* 1974. Vol. 86. P. 342—350.

Maizel A. L., Mehta S. R., Hauff S., Franzini D., Lachman L. B., Ford R. J. Human T lymphocyte/monocyte interaction in response to lectin: kinetics of entry into the S-phase // *J. Immunol.* 1981. Vol. 127. P. 1058—1064.

Mendelsohn J., Caviles A. Jr., Castagnola J. Proliferation of normal human lymphocytes in serum-free, albumin-free medium // *Cold Spring Harbor Conf. on cell proliferation*. New York: Cold Spring Harbor Lab. Publ., 1982. Vol. 9. P. 677—690.

Mendelsohn J., Hudig D., Castagnola J. DNA synthesis and proliferation of human lymphocytes in vitro. III. Fate of cycling cells in aging cultures of phytohemagglutinin stimulated human lymphocytes // *J. Cell. Physiol.* 1981. Vol. 106. P. 13—22.

Negendank W. G., Collier C. R. Ion contents of human lymphocytes. The effects of concanavalin A and ouabain // *Exp. Cell Res.* 1976. Vol. 101. P. 31—40.

Prasad K. V. S., Severini A., Kaplan J. G. Sodium ion influx in proliferating lymphocytes: an early component of the mitogenic signal // *Arch. Biochem. Biophys.* 1987. Vol. 252. P. 515—525.

Pressley T. A. Ion concentration-dependent regulation of Na,K-pump abundance // *J. Membr. Biol.* 1988. Vol. 105. P. 187—195.

Reed J. H., Alpers J. D., Nosell P. C., Hoover R. G. Sequential expression of protooncogenes during lectin-stimulated mitogenesis of normal human lymphocytes // *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1986. Vol. 83. P. 3982—3986.

Segel G. B., Gordon B. R., Lichtman V. A., Hollander M. M., Klemperer M. R. Exodus of ^{42}K and ^{86}Rb from rat thymus and human blood lymphocyte exposed to phytohemagglutinin // *J. Cell. Physiol.* 1976a. Vol. 87. P. 337—344.

Segel G. B., Hollander M. M., Gordon B. R., Klemperer M. R., Lichtman M. A. A rapid phytohemagglutinin induced alteration in lymphocyte potassium permeability // *J. Cell. Physiol.* 1975. Vol. 86. P. 327—336.

Segel G. B., Lichtman M. A., Hollander M. M., Gordon B. R., Klemperer M. R. Human lymphocyte potassium content during the initiation of phytohemagglutinin-induced mitogenesis // *J. Cell. Physiol.* 1976b. Vol. 88. P. 43—48.

Segel G. B., Simon W., Lichtman M. A. Regulation of sodium and potassium transport in phytohemagglutinin-stimulated human blood lymphocytes // *J. Clin. Invest.* 1979. Vol. 64. P. 834—841.

Severini A., Prasad K. V. S., Almeida A. F., Kaplan J. G. Regulation of the number of Na^+ , K^+ -pump sites after mitogenic activation of lymphocytes // *Biochem. Cell. Biol.* 1987. Vol. 65. P. 95—104.

Váradí A., Gilmore-Heber M., Benz E. J., Jr. Amplification of the phosphorylation site—ATP-binding site cDNA fragment of the Na^+ , K^+ -ATPase and the Ca^{2+} -ATPase of *Drosophila melanogaster* by polymerase chain reaction // *FEBS Lett.* 1989. Vol. 258. P. 203—207.

Zipfel P. F., Irving S. G., Kelly K., Siebenlist U. Complexity of the primary genetic response to mitogenic activation of human T cells // *Mol. Cell. Biol.* 1989. Vol. 9. P. 1041—1048.

Поступила 27 VI 1991

TRANSPORT AND DISTRIBUTION OF MONOVALENT CATIONS IN HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES ACTIVATED BY PHYTOHEMAGGLUTININ

A. A. Vereninov, E. V. Gusev, O. M. Kazakova, E. M. Klimenko, I. I. Marakhova, V. V. Osipov, F. V. Toropova

Institute of Cytology of the Academy of Sciences of the USSR, St. Petersburg

Potassium (rubidium) influx, sodium and potassium contents, as well as size distribution, DNA and protein contents and synthesis have been examined in PHA-activated human lymphocytes within 0.5—72 h. A complex set of ionic events was found to include at least two stages of the increase in potassium and sodium contents per g cell protein and in ouabain-sensitive potassium influx which are preceded by a decrease in potassium content by almost 17% within the first 2—5 h. The kinetics of potassium and sodium changes has own pattern for each of cations, thus indicating definite changes in the ouabain-resistant transport of potassium and sodium during the $G_0 \rightarrow G_1 \rightarrow S$ progression. The late increase in potassium content per g cell protein was found to correlate with the growth in cell size. This finding confirms the rule which was stated earlier for other animal cells, i. e. cells that prepare to proliferate are to raise their potassium per g cell protein up to the level of 0.8—1.0 mmole (Vereninov, Marakhova, 1986).