

УДК 576.35

ЦИТОЛОГИЯ

С. И. ПОЛИКАРПОВА

ДЕЙСТВИЕ СИБИРОМИЦИНА НА РОСТ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ IN VITRO

(Представлено академиком Б. Л. Астауровым 18 VII 1972)

В работе проведено исследование действия нового противоопухолевого антибиотика сибиромидина на рост первичной и перевиваемой культур клеток млекопитающих.

Этот антибиотик получен из культуры *Streptosporangium sibiricum* sp. nov. ^(1, 2). Согласно данным Г. Ф. Гаузе и др. ⁽³⁾, Г. Г. Гаузе и др. ⁽⁴⁾, сибиромидин, образуя устойчивые комплексы с ДНК, подавляет в клетках синтеза обеих нуклеиновых кислот: ДНК и РНК.

Целью данного исследования была проверка возможности различного действия сибиромидина на активно делящиеся и синтезирующие РНК клетки и на элементы, находящиеся вне митотического цикла (в фазе G_0). В качестве первых были избраны перевиваемая культура фибробластов китайского хомячка и трансформированные в области под действием фитогемагглютиниана) ФГА. В качестве вторых — не стимулированные ФГА малые лимфоциты крови, которые, как известно, находятся в фазе G_0 и обладают крайне низким уровнем синтеза РНК ⁽⁵⁾.

Фибробласты китайского хомячка *Gricetulus griseus* линии B41 dii FAF—28, клон 431 культивировали по общепринятому методу. Клетки выращивали в среде 199 + Игла (1:1) с добавлением 20% инактивированной сыворотки крупного рогатого скота, а также стрептомицина и пенициллина (по 50 ед/мл) при 37° в смеси 7% CO_2 в воздухе. Рассев клеток проводили в концентрации $5 \cdot 10^4$ кл/мл на пенициллиновые флаконы с покровными стеклами. Сибиромидин добавляли через 22 и 24 часа роста культуры в концентрациях 4; 0,4; 0,04; 0,004 $\mu\text{г/мл}$. В одной группе опытов этой серии антибиотик отмывали средой 199 3 раза через 1,5 часа после его введения. В другой — сибиромидин присутствовал в среде на протяжении всего периода роста культуры. Фиксация материала проведена на логарифмической фазе роста культуры, т. е. через 46 или 48 час. после ее посева. За 2 часа до фиксации в культуру введен колцемид (0,12 $\mu\text{г/мл}$). Контрольные варианты опытов отличались только отсутствием антибиотика в ростовой среде. Результаты этой серии опытов представлены на рис. 1. Как видно из рис. 1, полное ингибирование митотической активности клеток происходит при концентрациях антибиотика 0,4 и 4 $\mu\text{г/мл}$. Следует отметить, что при действии этих концентраций сибиромидина на культуру клеток китайского хомячка не обнаружены делящиеся клетки ни при 1,5, ни при 22 или 24 час. воздействия.

В двух сериях опытов, проведенных на культуре лейкоцитов человека, мы исследовали действие сибиромидина, с одной стороны, на бластклетки, с другой — на суспензию клеток, не подвергшихся стимуляции ФГА.

Лейкоциты периферической крови человека культивировали по методу Mooghead и др. ⁽⁶⁾ с небольшими модификациями. Кровь, взятую стерильным шприцем, смоченным гепарином (5000 ед/мл) из локтевой вены здоровых людей обоего пола, помещали в стерильную пробирку с 2—3

кашлими гепарина. Через 1,5—2 часа осторожно отсасывали надосадочную жидкость и производили подсчет клеток в камере Горяева с предварительным окрашиванием их 1% раствором геициан — виолета. Затем клетки

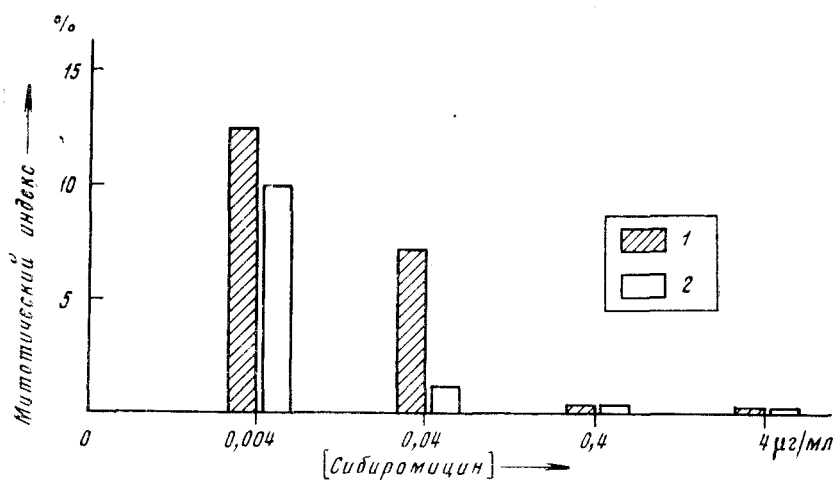


Рис. 1. Митотический индекс в зависимости от дозы сибиромидина и продолжительности его действия в клетках китайского хомячка *in vitro*. Концентрации после 1,5-часового (1) и после 22—24-часового (2) действия сибиромидина. Фиксация на 46 или 48 час. роста культуры

разводили средой 199 с пенициллином (50 ед/мл) из расчета $1-1.2 \cdot 10^6$ кл./мл. В первом варианте экспериментов к суспензии тотчас после ее получения добавляли ФГА (Wellcome) или бакто-фитогемагглютинин «М» (по 0,1 мл ФГА на 10 мл ростовой суспензии) и клетки рассевали на пенициллиновые флаконы (по 1,5—2 мл во флакон). В этой группе опытов сибиромидин добавляли на 22, 44 и 48 час. роста культуры концентрацией 0,1 и 0,4 µг/мл. Через 1,5 часа антибиотик или отмывали 2 раза средой 199, или оставляли в среде до 72 час. роста, т. е. до фиксации материала. В другой группе экспериментов на клеточную суспензию вначале действовали сибиромидином в концентрации 0,1 или 0,4 µг/мл в течение 30 мин., 1 или 1,5 час., а затем антибиотик отмывали 3 раза средой 199 и только после этого добавляли ФГА и рассевали клетки. Во всех случаях, когда происходил отмыв суспензии клеток от антибиотика, дальнейшее культивирование клеток вели в среде 199 с добавлением 20% аутологичной или эмбриональной телячьей сывороток. Для изучения числа бластотрансформированных клеток в разные сроки культивирования лейкоцитов проводили 20-минутную импульсную метку H^3 -тимидином (уд. акт. 4 С/ммоль, доза 1 µС/мл). Материал фиксировали на 22, 24, 44, 46, 48, 70 и 72 часа роста культуры. Начиная с 44 час. культивирования за 2 часа до фиксации в среду добавляли колцемид (0,12 µг/мл). Методика приготовления автографов и препаратов была изложена ранее (7).

Результаты первой группы опытов по действию сибиромидина на бластотрансформированные лимфоциты *in vitro* представлены на рис. 2. Как видно из рис. 2, на 72 часа роста культуры не обнаружены меченые интерфазы при концентрации сибиромидина 0,4 µг/мл и в случае отмыва и без отмыва антибиотика. При концентрации сибиромидина 0,1 µг/мл оказалось 26% меченых интерфаз без отмыва и 18% с отмывом антибиотика. В контрольных вариантах опытов было 35% меченых интерфаз на тот же срок фиксации.

В другой группе опытов было изучено действие сибиромидина (в течение 30 мин. или 1 часа) на суспензию клеток лейкоцитов человека с дальнейшей стимуляцией их ФГА и фиксацией на 72 часа роста культуры. Анализ материала показал полный распад и дегенерацию клеток. Вместе с тем, судя по результатам контрольных вариантов опытов на тот же срок фиксации было 27—41% меченых интерфаз.

Таким образом, на основании проведенных опытов можно сделать следующие заключения. Антибиотик сибиромидин в концентрации 0,4 мкг/мл полностью подавляет митотическую активность и синтез ДНК в культуре клеток китайского хомячка и лимфоцитов крови человека. Кратковременная (30 мин.) инкубация лейкоцитов крови с антибиотиком в дозах 0,1 и 0,4 мкг/мл полностью подавляет способность малых лимфоцитов к бласттрансформации под воздействием ФГА.

Для выяснения конкретных механизмов описанных эффектов действия сибиромидина необходимы дальнейшие исследования.

Автор считает своим долгом поблагодарить Н. Г. Хрущова за постоянное внимание к работе, Г. Г. Гаузе за любезно предоставленный им антибиотик и участие в обсуждении результатов, Н. Л. Боглаеву за оказание технической помощи.

Институт биологии развития
Академии наук СССР
Москва

Поступило
13 VII 1972

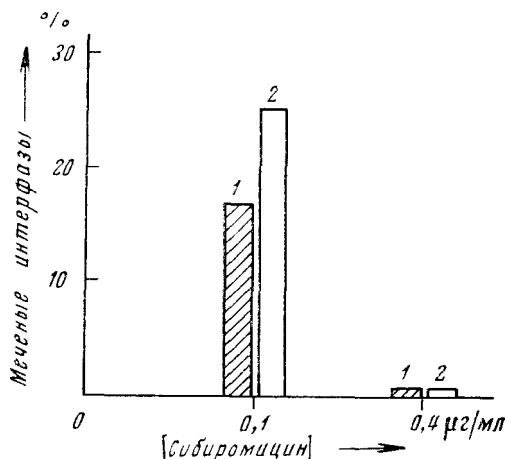


Рис. 2. Процент меченых H^3 -тимидином лимфоцитов (бластов) через 72 часа роста культуры в зависимости от продолжительности действия сибиромидина после его 1,5-часового (1) или 28-часового (2) действия

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Г. Ф. Гаузе, Т. П. Преображенская и др., Антибиотики, **11**, 963 (1939).
- ² В. А. Шорин, О. К. Россолимо, Антибиотики, **4**, 300 (1970).
- ³ Г. Ф. Гаузе, Ю. В. Дудник и др., Антибиотики, **10**, 867 (1970).
- ⁴ Г. Г. Гаузе, Ю. В. Дудник, С. М. Долгилевич, Антибиотики, **17**, № 5, 413 (1972).
- ⁵ Н. Р. Линг, Стимуляция лимфоцитов, М., 1971.
- ⁶ P. S. Moorhead, P. C. Nowell et al., Exp. Cell Res., **20**, 613 (1960).
- ⁷ Л. Я. Левина, С. И. Поликарпова, И. М. Шапиро, ДАН, **171**, № 4, 988 (1966).