

В. А. РОЗЕНБЛАТ, А. С. СЕРПИНСКАЯ, А. А. СТАВРОВСКАЯ

О МЕХАНИЗМЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К КОЛХИЦИНУ СУБЛИНИИ МЫШИНЫХ КЛЕТОК I

(Представлено академиком А. С. Спириным 16 III 1973)

Метафазные ингибиторы — колхицин, колцемид, винбластин и др. — разрушают организацию микротрубочек в клетке и связанные с микротрубочками функции. В частности, они разрушают веретено деления и блокируют клетки в метафазе. Колхицин, по-видимому, специфически взаимодействует с белком микротрубочек (⁴, ¹², ¹⁴).

Чувствительность различных клеток к колхицину неодинакова (¹⁻³, ⁶, ⁸). Вопрос, с чем может быть связана относительная резистентность к колхицину, удобно изучать в культуре клеток, используя сублинии одного и того же штамма, различающиеся по уровню чувствительности к препарату.

В данной работе мы сравнивали клетки линии L и резистентной к колцемиду (производному колхицина) и крос-резистентной к колхицину сублинии L-53 (⁴) и показали, что, во-первых, резистентные клетки гораздо хуже накапливают колхицин-Н³ и, во-вторых, это различие, по-видимому, не обусловлено изменением способности их микротрубочного белка связывать колхицин.

Клетки линии L и резистентной сублинии L-53 (⁴) росли на стекле в среде Игла с гидролизатом лактальбумина и с 10% бычьей сыворотки, причем L-53 — в присутствии 0,2 мкг/мл (0,5 мМ) колцемиде. Примерно неделю перед опытом клетки L-53 культивировали без колцемиде (1 расев, 1—2 смены среды).

Колхицин-Н³ (Amersham) с удельной активностью 1,5 С/ммол был получен в виде 0,67 мМ спиртового раствора.

Для опыта по связыванию колхицина-Н³ в культуре клетки рассевали накануне по 3 млн на флакон Карреля (~20 см²). Давали меченый колхицин, меняя среду. После инкубации клетки отмывали от свободной (внеклеточной) метки и растворяли одним из двух способов: 1) флакон с клетками быстро (30 сек.) ополаскивали 3 раза холодным физиологическим раствором (по 10—20 мл), а затем оставляли на несколько часов при 37° с 0,5 мл смеси, содержащей 0,125% трипсина и 0,5% тритона X-100 (Serva); 2) клетки снимали со стекла трипсином и отмывали их (как в работе (¹⁴)) 3 раза 5—10 мл среды или физиологического раствора центрифугированием при 100—200 g по 5—10 мин., осадок растворяли в 0,2 мл 1 М гуанина в метаноле при 37° в течение ночи.

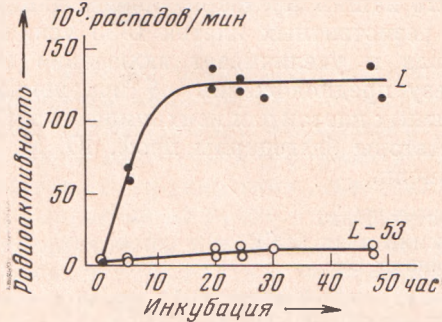
В опытах по связыванию колхицина-Н³ в гомогенатах получали клеточные осадки (см. выше способ 2), разводили их холодным 10 мМ К⁺-фосфатным буфером, рН 6,8—7,0; через 10—20 мин. клетки разрушали либо в стеклянном гомогенизаторе, либо интенсивным перемешиванием на магнитной мешалке, либо на ультразвуковом гомогенизаторе (MSE). Гомогенаты осветляли центрифугированием при 1500—15000 g в течение 20—30 мин. и инкубировали с меченым колхицином (1 мл инкубационной смеси получался из 10—20 млн клеток). Связанную с белком метку отделяли, используя фильтры из ДЭАЭ-бумаги (Watman, DE 81), по методам, описанным в работах (¹², ¹³).

Количество радиоактивности в образцах определяли на сцинтилляционных счетчиках «Mark-1» или «Mark-2» (Nuclear Chicago). Эффективность счета 30–50%. Оптическую плотность осветленных гомогенатов измеряли на спектрофотометре СФ-4.

На рис. 1 показана зависимость количества колхицина-Н³ в клетках L и L-53 от времени инкубации в среде, содержащей 0,5 μ M препарата. Клетки L связывают колхицин гораздо интенсивнее; их плато в 12 раз выше.

В ряде аналогичных опытов мы изучали накопление колхицина-Н³ в концентрациях 0,11 и 0,44 μ M клетками L и L-53 за 3 и 6 час. Количество колхицина в клетках L-53 по сравнению с L составляло 1,6–5,5%. Таким

Рис. 1. Накопление колхицина-Н³ целыми клетками L и L-53 в культуре. Клетки инкубировали при 37° в среде с 0,5 μ M колхицина-Н³. Отмывание после инкубации — быстрое, прямо во флаконах. Каждая точка соответствует одному флакону Карреля. 0 час. = 10–15 сек.



образом, в резистентных клетках накапливается меньше колхицина, чем в чувствительных.

Поскольку колхицин действует на микротрубочки, естественно, возникает вопрос, может ли белок микротрубочек резистентных клеток связывать колхицин. Для ответа на этот вопрос осветленные гомогенаты клеток L и L-53 инкубировали с колхицином-Н³ и определяли количество радиоактивности, связанной с белком (задерживающейся на ДЭАЭ-фильтрах). Результаты в пересчете как на число гомогенизированных клеток, так и на оптическую плотность инкубационной смеси приведены в табл. 1. Мы

Таблица 1

Связывание колхицина-Н³ с белком в гомогенатах клеток L и L-53

№ опыта	Связанная радиоактивность (10 ³ расп/мин) в пересчете на 1 млн гомогенизированных клеток			Связанная радиоактивность (10 ³ расп/мин) в пересчете на оптическую плотность инкубированной смеси		
	L	L-53	L-53/L	L	L-53	L-53/L
1	19	26	1,4	29	36	1,2
2	10	12	1,2	31	47	1,5
3	11	7,5	0,68	67	31	0,47
4	10	12	1,2	9,5	9,6	1,0

Примечание. Осветленные гомогенаты инкубировали 2 часа при 37° с 1,1 μ M колхицином-Н³.

не обнаружили больших различий в связывании колхицина белком чувствительных и резистентных клеток.

Результаты наших опытов показали, что возникновение резистентности к колцемиду и к колхицину у сублинии L-53 связано со значительным уменьшением поглощения колхицина целыми клетками. В то же время, гомогенаты клеток L и резистентных клеток L-53 связывают колхицин одинаково (во всяком случае, разница — если она и есть — мала по сравнению с разницей в накоплении препарата целыми клетками). Это значит,

что клетки L-53 резистентны, по-видимому, не за счет «резистентности» белка микротрубочек — объекта действия колхицина внутри клетки.

Поскольку разница в связывании колхицина снимается разрушением клеток, можно думать, что препарат хуже проникает в резистентные клетки, чем в чувствительные. Такой механизм резистентности для ряда других соединений описан в литературе. Именно изменением проницаемости плазматической мембраны обусловлена резистентность некоторых линий клеток хомячка к дауномицину и к актиномицину Д⁽⁹⁾, клеток мышиных лейкозов к метотрексату⁽¹⁰⁾ и к азотистому иприту⁽⁵⁾, клеток мышинной саркомы к ароматическому производному бис-гуанилгидразона⁽⁷⁾.

По нашим предварительным данным, обработка детергентом (твином-80) резистентных клеток L-53 усиливает митостатическое действие колцемида и увеличивает включение колхицина-Н³. Это также говорит в пользу предположения об измененной проницаемости мембраны резистентных клеток для колхицина и колцемида.

Авторы благодарны проф. Ю. М. Васильеву за постоянное внимание и помощь.

Институт белка
Академии наук СССР
Пушино-на-Оке

Поступило
6 III 1973

Институт экспериментальной и клинической онкологии
Академии медицинских наук СССР
Москва

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. А. Ставронская, Булл. эксп. биол. и мед., **76**, № 9, 143 (1973). ² А. А. Ставронская, Е. С. Какпакова, С. Л. Любский, Цитология, **14**, 2, 213 (1972). ³ M. Adams, J. R. Warr, Exp. Cell. Res., **71**, 473 (1972). ⁴ G. G. Borisy, E. W. Taylor, J. Cell. Biol., **34**, 2, 525 (1972). ⁵ G. J. Goldenberg, C. L. Vanstone et al., Cancer Res., **30**, 2285 (1970). ⁶ C. Granzow, U. Ehe-Galster, Zs. Krebsforsch., **74**, 4, 329 (1970). ⁷ M. T. Hakala, Biochem. Pharm., **20**, 81 (1971). ⁸ A. R. Midley, B. Pierce, F. J. Dixon, Science, **130**, 40 (1959). ⁹ H. Riehm, J. Biedler, Cancer Res., **32**, 6, 1195 (1972). ¹⁰ F. M. Sirotnak, S. Kurita, Cancer Res., **28**, 1, 75 (1968). ¹¹ E. W. Taylor, J. Cell. Biol., **25**, 145 (1965). ¹² R. C. Weisenberg, G. G. Borisy, E. W. Taylor, Biochemistry, **7**, 12, 4466 (1968). ¹³ L. Wilson, J. Bryan, A. Ruby, D. Mazia, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **66**, 3, 807 (1970). ¹⁴ L. Wilson, M. Friedkin, Biochemistry, **6**, 10, 3126 (1967).