

УДК 576.3

ЦИТОЛОГИЯ

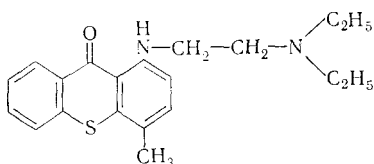
Г. Ф. МАКАРОВА, М. К. АБУЛАДЗЕ, О. И. ЕПИФАНОВА

**ИЗБИРАТЕЛЬНОЕ И ОБРАТИМОЕ ПОДАВЛЕНИЕ
СИНТЕЗА РИБОСОМНОЙ РНК ЛУКАНТОНОМ
В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

(Представлено академиком А. А. Баевым 12 VIII 1974)

Для избирательного выключения синтеза разных видов РНК в клетке широко используется антибиотик актиномицин D (¹⁻⁴). Однако, по имеющимся данным (^{3, 4}), актиномицину D (AMD) свойственны побочные эффекты, а также цитотоксичность, и действие его на синтез РНК не полностью обратимо.

Появилось сообщение (⁵) о способности к избирательному выключению синтеза рибосомной РНК (рРНК) в клетках млекопитающих другого соединения — лукантона, или мирацила D (MD), применявшегося ранее в клинике при лечении биларвизиса (⁶), а также для подавления роста бактерий (^{7, 8}). Известно, что MD, будучи, как и AMD, гетероциклическим соединением, состоящим из трех шестичленных колец, может образовывать комплекс с ДНК, угнетая, таким образом, ее способность к транскрипции (⁹).



Лукантон (Мирацил D)

Исследование (⁵), посвященное вопросу об избирательном действии MD на синтез рРНК, было выполнено на культуре клеток HeLa методом градиентного анализа нуклеотидного состава меченой РНК, но авторы не изучали действие MD на отдельные клеточные структуры, как это было сделано в свое время в отношении AMD (³).

В связи с этим в настоящей работе было проведено радиоавтографическое исследование действия MD на синтез РНК в культуре клеток млекопитающих отдельно во внеядрышковой части ядра и в ядрышке, являющемся местом синтеза рРНК. Был также изучен характер нарушения и восстановления синтеза макромолекул (РНК, ДНК, белка) после контакта клеток с MD и сопоставлено действие MD и AMD на жизнеспособность клеток.

Объектом исследования служил 431 клон однослойной культуры клеток китайского хомячка (штамм B11d-ii-FAF₂₈). Клетки выращивали в смешанной питательной среде (среда 199—50% и среда Игла—50%) с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота. Опыты проводили на культуре клеток в логарифмической фазе роста (48 час. после посева). AMD («Serva», ФРГ) применяли в концентрации 0,08 мкг/мл (¹⁰).

С целью изучения действия MD на синтез РНК клетки инкубировали в среде, содержащей ингибитор (Burroughs Wellcome & Co, London) в кон-

центрациях от 3 до 10 мкг/мл, и фиксировали в течение 2 час. с момента начала инкубации. За 10 мин. до фиксации клетки помещали в раствор ^3H -уридина (2 мкС/мл; 6 С/ммоль). Восстановление синтеза РНК, ДНК и белка изучали на протяжении 24 час. после 2 час. воздействия МД, помещая клетки перед фиксацией соответственно в растворы ^3H -уридина (см. выше) и ^3H -тимидина (1 мкС/мл; 5 С/ммоль) на 10 мин и в раствор ^3H -лейцина (2 мкС/мл; 1 С/ммоль) на 30 мин. На каждый срок исследования приходилось по пять повторностей.

Автографы готовили по методу, описанному ранее (10). На автографах, полученных с ^3H -уридином, подсчитывали число зерен серебра над ядрышком и внеядрышковой частью ядра (в 50 клетках). На других препаратах определяли митотический индекс (в 2000 клеток), индекс клеток, меченных ^3H -тимидином (в 1000 клеток), и среднее число зерен серебра на клетку, меченную ^3H -лейцином (в 50 клетках).

Таблица 1

Среднее число зерен серебра над ядрышком и внеядрышковой частью ядра в культуре клеток китайского хомячка в зависимости от продолжительности инкубации с лукантоном в разных концентрациях

Концентрация лукантона, мкг/мл	Время после начала инкубации с лукантоном, мин.				
	15	30	45	60	120
Я д р ы ш к о					
0			5,4±0,3		
3	4,4±0,4	5,1±0,8	4,7±0,3	4,1±0,5	3,6±0,0
6	5,6±0,4	5,0±0,2	4,6±0,3	5,1±0,5	5,5±0,1
7	3,9±0,8	3,3±0,2	3,1±0,1	4,0±0,8	3,8±0,2
8	3,8±0,8	2,0±0,2	2,4±0,2	3,3±0,3	2,9±0,5
9	2,7±0,3	2,2±0,5	1,3±0,5	1,5±0,5	0,7±0,2
10	2,9±0,4	1,8±0,5	0,9±0,3	1,3±0,5	1,4±0,8
Внеядрышковая часть ядра					
0			29,8±1,3		
3	26,3±2,3	29,4±1,1	28,0±1,3	22,4±1,5	27,3±2,7
6	20,5±1,3	24,8±2,9	18,1±1,5	19,1±3,1	25,9±2,8
7	22,3±1,1	20,8±4,4	17,6±5,4	24,8±1,5	21,8±1,4
8	28,0±3,9	21,2±1,4	26,2±3,8	26,5±2,9	28,3±3,6
9	29,1±1,3	31,1±1,1	21,5±1,4	28,1±3,2	27,7±2,3
10	31,4±3,5	22,8±1,7	19,0±4,4	23,4±1,5	31,3±2,7

Примечание. За 10 мин. до фиксации клетки помещали в раствор с ^3H -уридином (2 мкС/мл, 6 С/ммоль).

Для оценки жизнеспособности клеток при действии МД и АМД культивирование производили в пенициллиновых флаконах без стекол. Ежедневно с помощью трипсина готовили клеточную суспензию и подсчитывали в камере Горяева общее число клеток в 5 флаконах (по 10 камер на флакон). Жизнеспособность клеток контролировали путем подсчета числа окрашенных эозином (погибших) и неокрашенных клеток (из 200 клеток в каждой пробе).

Как следует из данных табл. 1, МД в концентрациях ниже 7 мкг/мл не оказывает действия на включение ^3H -уридина в клетки. В концентрации 7 мкг/мл он лишь незначительно снижает включение ^3H -уридина в ядрышко, но в концентрации 8 мкг/мл уже через 30 мин. после добавления в среду с клетками вызывает двукратное уменьшение этого показателя ($P=0,001$). В более высоких концентрациях (9 и 10 мкг/мл) МД подавляет включение ^3H -уридина в ядрышко на 50% ($P<0,0001$) через 15 мин. после добавления в среду и на 80% при более длительном контакте клеток с ингибитором. В этих условиях синтез РНК во внеядрышковой части ядра продолжается с достаточной интенсивностью.

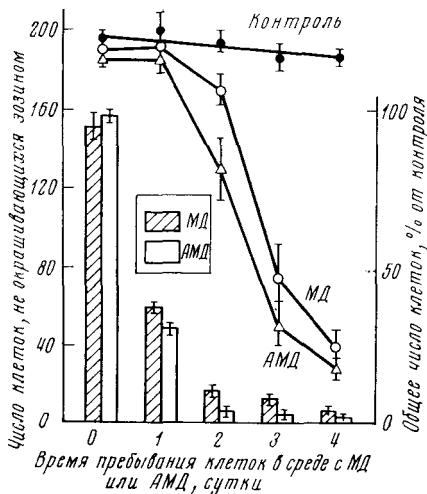


Рис. 1

Рис. 1. Действие MD (8 мкг/мл) и AMD (0,08 мкг/мл) на жизнеспособность клеток 1 — контроль, 2 — MD, 3 — AMD

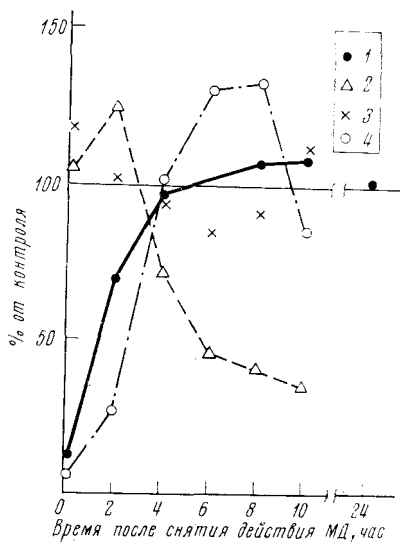


Рис. 2

Рис. 2. Синтез РНК, ДНК, белка и митотическая активность после 2 час. действия на клетки MD (9 мкг/мл): 1 — среднее число зерен серебра над ядрышком при включении ^3H -уридина, 2 — среднее число зерен серебра на клетку при включении ^3H -лейцина, 3 — индекс меченных ^3H -тимидином клеток, 4 — митотический индекс

Избирательное подавление синтеза рРНК в культуре клеток китайского хомячка достигается при использовании MD в несколько больших концентрациях (9 и 10 мкг/мл), чем в культурах клеток HeLa — 3 мкг/мл (5) и лейкемических клеток мыши линии L5178Y — 5 мкг/мл (11).

Далее была сопоставлена выживаемость клеток при действии MD и AMD в концентрациях, вызывающих достоверное снижение синтеза рРНК в исследуемой культуре в течение минимального времени контакта с клетками (10). Как следует из данных рис. 1, AMD вызывает более быстрое и резкое падение как общего числа клеток, так и числа жизнеспособных клеток, чем MD (на 3 сутки исследования $P=0,001$). Следовательно, MD менее токсичен для исследуемых клеток. Меньшая токсичность MD, по сравнению с AMD, была выявлена также в опытах на культуре клеток HeLa по их способности к образованию колоний (5).

На рис. 2 показан характер восстановления синтеза макромолекул после 2 час. инкубации клеток с MD. В первую очередь восстанавливается скорость включения ^3H -уридина в ядрышко, достигающая контрольного уровня уже через 4 часа после снятия действия ингибитора. Быстрое восстановление синтеза рРНК в сходных условиях было обнаружено и в культуре клеток HeLa (5). Как следствие нарушения синтеза рРНК (11), через 6 час. после снятия действия MD наблюдается двукратное снижение включения в клетки ^3H -лейцина, которое в дальнейшем нормализуется. Снижение скорости синтеза белка в сходных условиях наблюдается и после воздействия на культуру клеток млекопитающих AMD в низких концентрациях (11, 12). Число клеток, меченных ^3H -тимидином, на протяжении опыта существенно не меняется, в то время как в культуре клеток HeLa MD снижает скорость синтеза ДНК до 27% от контрольного уровня (5). По-видимому, как и при действии AMD в реакции клеток на MD имеют значение видовые различия (10).

Митотический индекс после 2 час. действия MD резко уменьшается, однако уже через 4 часа после удаления ингибитора он восстанавливается до контрольного уровня. В связи с тем, что эффект не был ранее описан,

Влияние лугантона на митотический индекс (в %) в культуре клеток китайского хомячка

Концентрация лугантона, мкг/мл	Время после начала инкубации с лугантоном, мин.				
	15	30	45	60	120
0			38,5±3,9		
3	38,2±2,4	28,3±0,8	27,1±0,6	27,5±0,6	36,9±0,6
6	26,0±3,0	27,0±2,0	17,5±2,0	13,0±2,8	19,0±3,8
7	31,6±1,1	11,0±0,8	9,5±0,6	11,5±0,7	10,5±0,5
8	22,4±3,2	13,6±1,0	9,9±0,6	10,0±0,8	12,0±0,9
9	32,1±1,8	5,0±0,6	11,8±1,5	6,7±0,6	6,3±0,8
10	18,2±3,1	9,4±0,7	7,7±0,7	4,8±0,7	10,6±2,1

нами была изучена митотическая активность на протяжении 2 час. контакта клеток с MD. Как следует из данных табл. 2, митотический индекс в исследуемой культуре снижается через 45 мин. воздействия MD в концентрации 6 мкг/мл, и через 30 мин. — при использовании более высоких концентраций ингибитора. Вычисление процентного содержания отдельных фаз митоза показало, что в результате действия MD в концентрациях 8 и 9 мкг/мл клетки на стадии метафазы не накапливаются, как это было обнаружено при действии на культуру клеток китайского хомячка 0,08 мкг/мл AMD (¹³). В то же время абсолютное число профаз на всем протяжении инкубации клеток с MD остается таким же, как и в контроле. Следовательно, уменьшение митотического индекса связано в данном случае, по-видимому, не с подавлением вступления клеток в митоз, а, главным образом, с гибелью клеток в метафазе, что можно наблюдать и при микроскопическом изучении препаратов. Однако часть клеток способна завершить деление в присутствии ингибитора, о чем свидетельствует наличие на препаратах поздних фаз митоза.

Результаты исследования показывают, что в культуре клеток китайского хомячка MD в концентрациях 9—10 мкг/мл избирательно подавляет синтез рРНК. После удаления из среды ингибитора синтез рРНК возобновляется практически сразу же, достигая нормального уровня через 4 часа. В исследованных концентрациях MD, как и AMD, нарушает течение митоза, однако после снятия действия ингибитора митотическая активность быстро восстанавливается. Обратимость действия MD на клетки по его меньшей токсичности, по сравнению с AMD, делают возможным его использование для избирательного выключения синтеза рРНК в культуре клеток млекопитающих на протяжении всей интерфазы митотического цикла.

Институт молекулярной биологии
Академии наук СССР
Москва

Поступило
2 VIII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Ю. О. Сазыкин, Антибиотики как ингибиторы биохимических процессов, М., 1968.
² Actinomycin, Nature, Formation, and Activities, N. Y.—London—Sydney, 1968.
³ R. P. Perry, Exp. Cell. Res., v. 29, 400 (1963). ⁴ M. M. Elkind, K. Sakamoto, C. Kamper, Cell Tiss. Kinet., v. 1, 3, 209 (1968). ⁵ R. Bases, F. Mendez, J. Cell. Physiol., v. 74, 3, 283 (1969). ⁶ D. M. Blair, Bull. World Health Org., v. 18, 5—6, 989 (1958). ⁷ I. B. Weinstein, R. Chernoff et al., Mol. Pharm., v. 1, 3, 297 (1965). ⁸ I. B. Weinstein, R. Carchman et al., Biochim. et biophys. acta, v. 142, 440 (1967). ⁹ I. B. Weinstein, E. Hirschberg, Progr. in Mol. and Subcell. Biol., v. 2, 232 (1971). ¹⁰ Г. Ф. Макарова, О. И. Енуфанова, Цитология, т. 16, 5, 569 (1974). ¹¹ L. N. Kapp, S. Okada, Exp. Cell Res., v. 72, 2, 473 (1972). ¹² E. V. Gaffney, R. M. Nardone, In vitro, v. 7, 5, 308 (1972). ¹³ N. Craig, J. Cell. Physiol., v. 82, 2, 133 (1973). ¹⁴ И. Н. Смоленская, Т. П. Мазнина, Цитология, т. 13, 11, 1347 (1974).