

Л. Б. МАРГОЛИС, член-корреспондент АН СССР Л. Д. БЕРГЕЛЬСОН

ВВЕДЕНИЕ МИТОТИЧЕСКИХ ЯДОВ В ЛИПОСОМАХ КАК МЕТОД ПОВЫШЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОК, РЕЗИСТЕНТНЫХ К ЭТИМ ЯДАМ

Известно, что резистентность ряда клеток к определенным химическим агентам обусловлена пониженной проницаемостью их плазматических мембран (¹⁻³). Резистентность такого типа, в частности, продемонстрирована для клеток сублинии L-53. У этих клеток значительно понижена чувствительность к митотическому яду — колхицину и его производному — колцемиду (^{4, 5}).

В последнее время предприняты попытки модифицировать свойства клеток и клеточных мембран с помощью искусственных липидных везикул (липосом) (^{7, 6}). В настоящей работе нам удалось с помощью липосом снизить резистентность клеток L-53 к колхицину. Показано, что колхицин проникает с липосомами внутрь резистентных клеток, сохраняя при этом свою митостатическую активность.

Фосфатидилсерин получали из мозга быка (⁸), фосфатидилхолин выделяли из куриных яиц (⁹). Чистоту липидов контролировали тонкослойной хроматографией, количество липидов определяли по содержанию фосфора (¹⁰). Колцемид получен от фирмы «CIBA» (Англия). ³H-колхицин (удельная активность 2С/ммоль), ³H-инулин (удельная активность 690 мС/ммоль) получены от фирмы «Amersham» (Англия).

Липосомы получали следующим образом: в круглодонную колбу помещали 25 мкмоль фосфатидилхолина или фосфатидилсерина с фосфатидилхолином (1:9) в органическом растворителе. Раствор упаривали досуха на роторном испарителе и в колбу наливали солевой раствор Хэнкса (с.р.Х.), содержащий митостатик. Колбу встряхивали механически (1000 раз/мин.) в течение 10 мин. Полученную суспензию липида, в дальнейшем именуемую грубой фракцией липосом, подвергали озвучиванию на дезинтеграторе MSE (Англия) или УЗДН-1 (СССР) при 22 кгц в течение 15 мин. при температуре 4°. Суспензию липосом разводили культуральной средой до требуемой концентрации и очищали от частиц металла центрифугированием на цитоцентрифуге (15 мин. при 5000 об/мин.). В опытах по инкубации липосом с клетками исходную суспензию липосом разводили в 5 раз.

Клетки сублинии L-53 получены в Институте экспериментальной и клинической онкологии АМН СССР А. А. Ставровской. Условия культивирования, приготовление препаратов для счета метки и распределения клеток по фазам митоза были аналогичны описанным ранее (^{5, 11}). В опытах по связыванию метки клетки инкубировали 1 сутки в пенициллиновых флаконах, либо во флаконах Карреля. Использовали культуры плотностью $1,3-1,5 \times 10^5$ клеток/см². Измерение радиоактивности проводили на сцинтилляционных счетчиках Mark-I и Mark-II фирмы Nuclear Chicago (США). Эффективность счета составляла 25—40%.

Сравнение средних значений результатов различных опытов проводили по критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Известно, что озвученные (монобислойные) липосомы могут захватывать и удерживать водорастворимые вещества, не способные проходить через липосомальную мембрану (¹²).

Для того чтобы выяснить возможность включения в состав липосом такого амфифильного соединения как колхицин, необходимо прежде всего было оценить его коэффициент распределения между водой и неполярной фазой. Измерения, проведенные на системе вода — октанол (1:1 v/v) показали, что после внесения ^3H -колхицина в концентрации $0,5 \cdot 10^{-3}$ мкМ в водную фазу, происходит быстрое перераспределение метки. Равновесие устанавливается менее, чем за 5 час. Отношение радиоактивности гидрофильной к гидрофобной фазе составляет при этом 1:14. Из этих данных следует, что мембрана липосом проницаема для колхицина и что «захваченный» и наружный колхицин обмениваются свободно.

Это предположение подтверждается опытами по связыванию колхицина липосомами. После инкубации липосом (20 мкмол. липида) с ^3H -колхи-

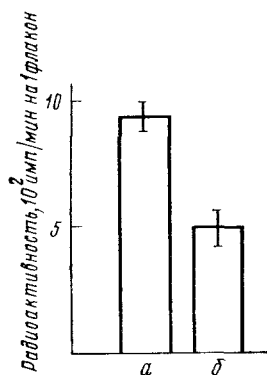


Рис. 1

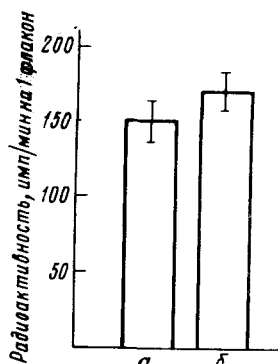


Рис. 2

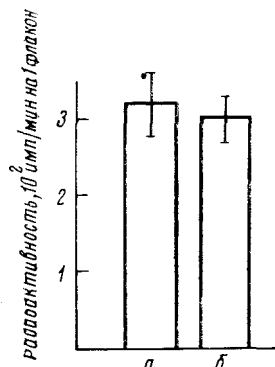


Рис. 3

Рис. 1. Связывание ^3H -колхицинсодержащих липосом клетками сублинии L-53. а — радиоактивность культур клеток (здесь и на рис. 2 и 3 350 000 клеток на 1 флакон), инкубированных 8 час. с ^3H -колхицинсодержащими липосомами; б — контрольные клетки, инкубированные в растворе свободного ^3H -колхицина. Различия между а и б достоверны $P < 0,01$. Построено по данным 3-х опытов

Рис. 2. Связывание ^3H -инулина клетками сублинии L-53 в присутствии липосом. а — радиоактивность культур клеток, инкубированных 8 час. в растворе ^3H -инулина (1 мкС/мл) в присутствии липосом; б — в контрольном растворе ^3H -инулина. Различия между опытом и контролем недостоверны. Построены по данным 2-х опытов

Рис. 2. Связывание ^3H -колхицина клетками сублинии L-53, предынкубированных с липосомами. а — радиоактивность культур клеток, предынкубированных с липосомами и затем инкубированных в растворе ^3H -колхицина; б — контрольные культуры, инкубированные с ^3H -колхицином без предынкубации с липосомами. Различия между опытом и контролем недостоверны. Построено по данным 4-х опытов

цином (1 мкС, 1 мл) с последующим отделением свободного ^3H -колхицина гель-фильтрацией, через сефадекс G-25 около 2% метки оказалось связанной с липосомами. В перерасчете на концентрацию (13) относительное содержание метки в липосомах в 10—15 раз выше, чем во внешней среде.

Сходные результаты дали опыты по измерению «выхода» колхицина из фракции грубых (многослойных) липосом. Липосомы, полученные в с.р.Х., содержащем ^3H -колхицин (20 мМ липида, 1 мкС/мл ^3H -колхицина) отделяли от свободной метки центрифугированием. После этого липосомы вновь ресуспендировали в с.р.Х., не содержащем метки. После 8 час. инкубации липосомы вновь отделяли и измеряли радиоактивность липосом и надосадочной жидкости. Измерения показали, что 95% метки перешло за время инкубации во внешнюю среду. И в этом случае конечная концентрация метки в липосомах была в несколько раз выше, чем во внешней среде.

Таким образом, колхицин связывается с гидрофобной фазой липосом и (или) удерживается в их внутреннем объеме только при наличии этого

вещества во внешней среде. Равновесное распределение концентраций колхицина сдвинуто в сторону гидрофобной фазы.

Мы исследовали связывание липосом, содержащих колхицин с клетками L-53. Изучение культур после инкубации с липосомами в течение 12 час. показало, что морфология клеток не нарушена. Плотность клеточной популяции в обработанных липосомами и контрольных культурах достоверно не различается.

На рис. 1 представлены результаты связывания ^3H -колхицинсодержащих липосом клетками L-53. Как видно из этой гистограммы, связывание метки клетками в этих условиях достоверно увеличилось почти в 2 раза ($P < 0,01$). Из этих опытов остается, однако, неясным, происходит ли такое увеличение связывания метки за счет ^3H -колхицина, находящегося в липосомах, либо за счет свободного ^3H -колхицина. Действительно, можно предположить, что в присутствии липосом клетки либо эндоцитируют среду с ^3H -колхицином, либо становятся более проницаемы к этому агенту. Мы попытались проверить эти возможности.

Инкубация с клетками липосом в среде, содержащей ^3H -инулин, показала (рис. 2), что с клетками связывается в этом случае столько же метки, сколько и в контроле, когда клетки инкубировали в среде с ^3H -инулином, не содержащей липосомы. Таким образом, липосомы не стимулируют эндоцитоз среды. Эти данные согласуются с данными (14), где показано, что угнетение эндоцитоза не влияет на связывание ^3H -инулина, заключенного в липосомах.

Влияние липосом на проницаемость плазматических мембран для свободного колхицина проверяли следующим образом: клетки L-53 инкубировали в течение 8 час. с липосомами, не содержащими метки, затем культуры отмывали от липосом с.р.Х. и инкубировали еще 50—60 мин. в растворе ^3H -колхицина (1 мкС/мл). Результаты измерений связанной с клетками метки представлены на рис. 3. Как видно из этих данных, инкубация клеток L-53 с липосомами не увеличивает их проницаемости для колхицина.

Таким образом, увеличение связывания ^3H -колхицина клетками L-53 в присутствии H -колхицинсвязанных липосом, происходит за счет метки, заключенной в липосомах. Остается, однако, неясным, проникает ли содержащийся в липосомах митостатик внутрь клеток. Для того чтобы выяснить это, мы определяли митостатическую активность колцемидсвязанных липосом по отношению к резистентным к колцемиду клеткам L-53. Как видно из табл. 1, инкубация клеток с такими липосомами уменьшает процент пост-метафазных клеток в культуре, по сравнению с контролем.

Таблица 1

Митостатический эффект колцемидсвязанных липосом на клетки L-53 (% пост-метафазных клеток к контролю)

№ опыта	Свободный колцемид	Липосомы без колцемид	Колцемидсвязанные липосомы
1	98	98	78
2	100	104	82
3	—	100	84
Среднее	99±1	101±2	81±2

В каждой культуре подсчитывалось 200 митотических клеток из 2-х препаратов в каждом опыте. Клетки культивировали 8 час. в среде с липосомами (5 ммол липида), колцемидом (0,27 мкмол или колцемидсвязанными липосомами (5 ммол липида, 0,27 мкмол колцемид). Уменьшение доли пост-метафазных клеток под действием колцемидсвязанных липосом достоверно ($P < 0,01$).

Уменьшение доли клеток в пост-метафазных фазах митоза сравнительно невелико, но статистически достоверно. Возможно, содержащееся лишь некоторых из связавшихся с клеточной поверхностью липосом попадает внутрь клетки. На это указывают также данные опытов, в которых были использованы липосомы с пероксидазой (15) и ферритином (16), а затем проведен электронно-микроскопический анализ распределения этих веществ в клетках. Так как неизвестна зависимость между количеством кол-

цемида, проникающего в клетку, и величиной вызываемого им митостатического эффекта, то в наших опытах трудно оценить, сколько митостатика проникло в клетки. Однако, поскольку известно, что коллемид останавливает клетки в метафазе, связываясь с субъединицами микротрубочек веретена, то можно считать доказанным, что, по крайней мере, часть связанного с липосомами митостатика проникает внутрь клеток.

Таким образом, результаты настоящей работы показывают, что колхицин, амфифильное соединение, растворимое преимущественно в липидной фазе, связывается с липосомами; по крайней мере часть такого колхицина может проникнуть в резистентные к этому агенту клетки L-53.

Механизм проникновения липосомально-связанного колхицина внутрь резистентных клеток может быть двояким: можно предположить, что липосомы проникают внутрь клетки и там выпускают свое содержимое; возможно также, что липосомы встраиваются в мембраны клеток таким образом, что их содержимое оказывается в цитоплазме. В последнем случае возможно удастся использовать липосомы не только для переноса веществ через плазматические мембраны, но и для модификации свойств клеточной поверхности.

Авторы выражают благодарность Л. И. Барсукову за помощь в выделении липидов и ценные советы и А. А. Ставровской, любезно предоставившей клетки L-53 и высказавшей многочисленные ценные замечания.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
21 VII 1975

Институт биоорганической химии
им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР
Москва

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ M. N. Goldstein, K. Ham, F. Amrod, Science, v. 151, 1555 (1969); H. Riehm, J. L. Bieler, Cancer Res., v. 32, 1195 (1972). ² C. Cremisi, G. E. Sonenshein, P. Tournier, Exp. Cell Res., v. 89, 89 (1974). ³ J. F. Till, R. Baker et al., Federat. Proc., v. 32, 29 (1973). ⁴ А. А. Ставровская, Бюлл. эксп. биол. и мед., т. 76, 9, 143 (1973). ⁵ В. А. Розенблат, А. С. Серпинская, А. А. Ставровская, ДАН, т. 211, № 6 (1973). ⁶ M. I. Inbar, M. Shinitzky, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 71, 2128 (1974). ⁷ D. Papahadjopoulos, E. Mayhew et al., Nature, v. 252, 163 (1974). ⁸ Phospholipids (G. B. Ansell and I. H. Hawthorne Ed.), Amsterdam, 1964, p. 101. ⁹ R. M. S. Dawson, Biochem. J., v. 88, 414 (1963). ¹⁰ E. Lerboch, B. Deutik, Biochem. J., v. 337, 477 (1963). ¹¹ А. А. Ставровская, Т. П. Стромская, Е. С. Капкова, Neoplasma, v. 20, 3 (1973). ¹² A. D. Bangham, Ann. Rev. Biochem., v. 41, 753 (1972). ¹³ D. Papahadjopoulos, G. Poste, B. E. Schaeffer, Biochim. et biophys. acta, v. 323, 23 (1973). ¹⁴ R. E. Pagano, L. Huang, C. Wey, Nature, v. 252, 166 (1974). ¹⁵ W. E. Magee, C. W. Goff et al., J. Cell Biol., v. 63, 492 (1974).