

УКРАИНСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

На правах рукописи

СУШЕЛЬНИЦКИЙ
Сергей Иларьевич

**РОЛЬ ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ФАКТОРА
РОСТА- β В РЕГУЛЯЦИИ ПРОЛИФЕРАЦИИ
КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК**

03.00.04 — биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

ЛННБ України ім.В.Стефаніка



00816044 (N)

Робота виконана в Львівському відділенні Інститута біохімії ім. А. В. Палладіна АН України в відділі біохімії клітинної диференціровки.

Научний керівник: — кандидат біологічних наук СТОЙКА Р. С.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, В. В. СНИТИНСКИЙ, доктор біологічних наук, М. Д. ЛУЦИК.

Ведущая організація — Інститут молекулярної біології і генетики АН України (г. Київ).

Захист состоится « 24 » марта 1992 г. в « 10⁰⁰ » часів на засіданні спеціалізованого ради Д. 020. 14. 01 по захисті дисертацій на соискание ученої ступені доктора наук при Українському науково-дослідницькому Інституті фізіології і біохімії сільськогосподарських тварин АН України (290034, г. Львів — 34, ул. В. Стуса, 38).

С дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Українського НДІ фізіології і біохімії сільськогосподарських тварин.

Автореферат розослан « 10 » грудня 1992 г.

Учений секретар
спеціалізованого ради,
кандидат біологічних наук

В. Е. РОБАК

АНБ ім. В. Стефаніка
АН УРСР

Актуальность проблемы: Трансформирующий фактор роста β -типа (ТФР- β) - это полипептид, который регулирует пролиферацию, дифференцировку, а также метаболические процессы у многих типов клеток. Показано, что в присутствии эпидермального фактора роста он стимулирует субстратнезависимую пролиферацию клеток, полученных из нормальных тканей мезенхимного происхождения, и ингибирует пролиферацию клеток из эпителиальных тканей, в том числе из опухолей / Roberts A. B. et al. 1983, Moses H. et al. 1987, Sporn M. B. et al. 1987. /. Механизмы, которые обеспечивают такое стимулирующее или ингибирующее влияние ТФР- β на клеточную пролиферацию пока не изучены. Между тем, исследование этих механизмов весьма актуально в связи с предложениями о практическом использовании ТФР- β в медицине для угнетения роста злокачественных клеток, стимуляции заживления ран и для лечения ряда патологий у животных и человека /Allen J. B. et al. 1990, Joyce M. E. et al. 1989, Noda M. et al. 1989, Roberts A. B., Sporn M. B. 1985 /.

Влияние ТФР- β на клетки - мишени связано с функционированием сложной системы регуляторных связей в клетках. Изучение этой системы необходимо не только для обоснования целесообразности и безопасности применения ТФР- β в медицине, но и для познания молекулярных механизмов регуляции пролиферации и дифференцировки клеток животных и человека.

Имеются основания считать, что центральную роль в молекулярных механизмах регуляторного действия полипептидных факторов роста на клетки играют специфичные рецепторы на поверхности клеток. Регуляция функционирования рецепторов ТФР- β пока недостаточно изучена / Wakefield L. 1987 /. Недостаточно исследованы и внутриклеточные регуляторные механизмы, определяющие направленность действия ТФР- β на клеточную пролиферацию.

Цель и задачи работы: Исходя из вышесказанного, в диссертационной работе была поставлена цель - изучить особенности влияния ТФР- β на пролиферацию разных типов клеток

и исследовать некоторые этапы в молекулярных механизмах действия этого фактора.

Для достижения поставленной цели решали следующие задачи:

1. Получить высокоочищенный препарат ТФР- β .
2. Изучить влияние ТФР- β и его комбинаций с ЭФР и инсулином на пролиферацию в монослое клеток разных линий, полученных из нормальных тканей и опухолей.
3. Исследовать влияние ТФР- β и его комбинаций с ЭФР и инсулином на интенсивность субстратнезависимой пролиферации в среде с полужидким агаром у разных типов клеток, полученных из нормальных тканей и опухолей.
4. Изучить регуляцию специфического связывания ТФР- β под влиянием ЭФР и /или/ инсулина, а также понижающую регуляцию и кооперативность рецепторов данного фактора роста.
5. Изучить влияние ТФР- β и его комбинаций с ЭФР и инсулином на содержание cAMP и cGMP в культивируемых клетках исследуемых линий.

Научная новизна: Впервые проведено комплексное изучение действия ТФР- β в комбинациях с ЭФР и инсулином на пролиферацию в монослое клеток, полученных из нормальных тканей и из опухолей, в зависимости от продолжительности инкубации, концентрации сыворотки в культуральной среде и плотности клеток на единицу площади в культуре. Обнаружено, что колониеобразование у псевдонормальных клеток, культивируемых в среде с полужидким агаром регулируется ТФР- β и существенно зависит от одновременного действия на клетки ЭФР и инсулина. Характер влияния самого ТФР- β на пролиферацию опухолевых клеток существенно зависит от типа опухоли, из которой были получены клетки.

Впервые обнаружена отрицательная кооперативность рецепторов ТФР- β у клеток линии NRK-49F. Изучена трансмодуляция рецепторов ТФР- β под действием ЭФР и инсулина.

Впервые показано, что ТФР- β и его комбинации с ЭФР и инсулином влияют на содержание cAMP и cGMP в культивируемых клетках. Обнаружено, что ТФР- β увеличивает в большинстве случаев отношение [cAMP]/[cGMP] в клетках.

Научно - практическая значимость работы: Усовершенствован

метод получения высокоочищенного ТФР- β из тромбоцитов крови животных. С его помощью достигнут выход препарата ТФР- β , равный около 10 мкг из 1 г сырой тромбоцитарной массы, что приблизительно в 10 раз выше, чем при использовании ранее предложенных методов / Assoian R. K. et al. 1985 /.

Результаты анализа действия ТФР- β на пролиферацию клеток разного происхождения указывают на целесообразность использования ТФР- β в комбинации с другими полипептидными факторами роста при разработке фармацевтических форм и терапевтических схем, пригодных для клинических целей.

Апробация результатов исследования: Материалы диссертации доложены и обсуждены на V Украинском биохимическом съезде (Ивано-Франковск, 1987), Всесоюзном симпозиуме "Молекулярные и функциональные механизмы онтогенеза" (Харьков, 1987), II Всесоюзном совещании по изучению роли морфогенетически активных факторов в различных процессах (Пушино, 1988), конференциях молодых ученых Института биохимии им. А. В. Палладина АН Украины и Львовского отделения Института биохимии АН Украины (Киев, Львов, 1987 - 1988), семинарах в Центральном институте молекулярной биологии (Берлин, ФРГ, 1990), и в Институте молекулярной биологии и физиологии Свободного университета г. Берлина (Берлин, ФРГ, 1991).

Публикация результатов исследования: По теме диссертационной работы опубликовано 6 статей и 8 тезисов сообщений.

Структура и объем диссертации: Диссертационная работа изложена на 147 страницах, состоит из введения, обзора литературы, главы "Материалы и методы", 5 глав собственных исследований, обсуждения результатов, выводов и списка цитированной литературы, содержащего 207 ссылок на работы отечественных и зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 24 рисунками и 6 таблицами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы клетки линий NIH-3T3 и Swiss-3T3 из эмбрионов мыши, NRK-49F - из нормальной почки крысы, A-549 - из аденокарциномы легких человека, CCL-64 - из карциномы

легких норки, HT-1080 - из фибросаркомы человека, PC-103 /клоны Зсб и З84/5 / - из саркомы, индуцированной имплантацией полихлорвиниловой пластинки мышам линии СВА, CHO-719с/3 - из яичника китайского хомячка. Клетки линий PC-103 и А-549 получены из коллекции клеточных культур Института канцерогенеза Всесоюзного онкологического научного центра АМН СССР / г. Москва /. Клетки других перечисленных линий получены из коллекции клеточных культур Института цитологии АН СССР / г. Санкт-Петербург /. Клетки линий N1Н-3Т3, Swiss-3Т3, NRK-49F, А-549, CCL-64, HT-1080, CHO-719с/3 культивировали в среде Игла в модификации Дальбекко / DMEM, Flow Lab., Великобритания / с добавлением 10% или 3% / для клеток линии CHO-719с/3 / сыворотки крови плодов крупного рогатого скота / Диалек, г. Минск /, а клетки линии PC-103 - в среде Игла / MEM, Flow Lab., Великобритания / с 10% сыворотки крови крупного рогатого скота /Московский мясокомбинат /.

ТФР- β получали из свежeweделенных с помощью дифференциального центрифугирования тромбоцитов крови свиньи. На первом этапе очистки проводили кислото - этанольную экстракцию тромбоцитов / Asoian R. K. et al. 1985 /. Последующие этапы включали разделение полученного экстракта на колонке /8.5x105см /, наполненной Акрилексом P-30 / Reanal, Венгри /, используя 1M CH₃COOH в качестве элюента и разделение фракции, содержащей ТФР- β , на колонке / 1.3x120 см /, наполненной Акрилексом P-60, с использованием в качестве элюента 7M мочевины в 1M CH₃COOH. Биологическую активность ТФР- β определяли по влиянию на субстратзависимую / монослойная культура / и субстратнезависимую / культивирование в среде с полужидким агаром / пролиферацию клеток линий NRK-49F, N1Н-3Т3, А-549, CCL-64.

Влияние ТФР- β и его комбинаций с ЭФР и инсулином на пролиферацию клеток разных линий в монослое изучали, культивируя клетки в пластиковых 24- или 96-луночных планшетах /Linbro, Nunk, США / согласно общепринятым методам культивирования. Добавление в культуральную среду факторов роста, сыворотки крови, время инкубации с ними клеток, инкубация

с радиоактивными предшественниками нуклеотида / ^3H -тимидин или ^{14}C -тимидин / осуществляли в соответствии с протоколом каждого из опытов. По окончании инкубации определяли интенсивность включения радиоактивной метки в нерастворимую в трихлоруксусной кислоте фракцию клеток / Fernandez-Pol J. A. et al. 1986, Hamel E. et al 1988 /, используя сцинтиляционный счетчик MARK III / Tracor Europa, Нидерланды /. Все опыты повторяли не менее 3-х раз с 3 - 4 параллельными экспериментами в каждом опыте. В отдельных контрольных опытах пролиферативную активность клеток определяли по изменению их количества методом подсчета в камере Горяева.

Для изучения влияния ТФР- β в комбинациях с ЭФР и инсулином на проявление трансформированного фенотипа использовали тест на клонирование клеток в среде с полужидким агаром, как наиболее адекватно отображающий степень трансформированности клеток / van Zoelen E. J. et al. 1988 /. В 40-мм чашки / ПО "Полимер", г. Санкт-Петербург / заливали 1 мл среды культивирования, содержащей 0.5% агара /Difco, США/. Затем вносили 1 мл суспензии клеток в среде культивирования, содержащей 0.3% агара с добавленными тестируемыми факторами. Чашки инкубировали 10 - 14 суток в CO_2 инкубаторе /ГПИ-1, г. Санкт-Петербург / в присутствии 5% CO_2 при 100% влажности. По окончании инкубации в каждой чашке подсчитывали количество колоний диаметром не менее 52 мкм. Каждый опыт повторяли не менее 3-х раз с 3-мя параллельными экспериментами.

^{125}I -ТФР- β получали по методу Raff и Риццино / Raff E., Rizzino A. 1986 / с использованием хлорамина Т. Удельная активность препарата ^{125}I -ТФР- β составляла 70-150 мКи/мкг. Идентификацию специфичных рецепторов ТФР- β проводили на клетках линии NRK-49F. ^{125}I -ТФР- β ковалентно "сшивали" со специфическими рецепторами дисукцинимидилсубератом в присутствии и в отсутствие 500 - кратного избытка немеченого лиганда с последующим разделением белков электрофорезом в градиенте концентрации полиакриламида / 5 - 10 % / с добавлением додецилсульфата натрия в буферной системе Лемли и

автордиографией.

Понижающую регуляцию / down regulation / рецепторов ТФР- β определяли по изменению уровня специфического связывания ^{125}I -ТФР- β после предварительной инкубации клеток в течение 2-х часов с немеченым ТФР- β .

Количество специфических рецепторов ТФР- β и их сродство к лиганду определяли с использованием клеток линий А-549 и NRK-49F согласно рекомендациям Вейкфилда и сотр. / Wakefield L. et al. 1987 /. Клетки высевали в 24- или 96-луночные планшеты в среде культивирования. После прикрепления клетки отмывали от сыворотки и добавляли в среду инкубации разные количества ^{125}I -ТФР- β / концентрации от 1 до 150 пМ /. В зависимости от варианта опыта добавляли также Э.Р / 5 мкг/мл; Serva / и [или] инсулин /1 мкг/мл; Serva/.

Для определения уровня неспецифического связывания в отдельные пробы, содержащие 10, 50, 100 пМ ^{125}I -ТФР- β , добавляли 500 - кратный избыток немеченого ТФР- β . После инкубации клеток в течение 2 часов определяли содержание радиоактивной метки в среде и метки, специфически связанной с рецепторами ТФР- β на клетках, с использованием счетчика "Compu-Gamma" / LKB, Швеция /. Расчет кинетических параметров связывания ^{125}I -ТФР- β осуществляли по методу Скэтчарда / Scatchard G. 1949 /.

Для выявления кооперативности рецепторов ТФР- β использовали метод, основанный на определении кинетики диссоциации меченого лиганда в присутствии и в отсутствие немеченого лиганда / Corin R. E. et al. 1982 /.

Определение содержания cAMP и cGMP в клетках линий NRK-49F, NIH3T3 и А-549 проводили с использованием стандартного набора фирмы "Amersham Inc." / Великобритания /. Метод основан на конкуренции немеченых циклических нуклеотидов в пробе с фиксированным количеством меченых тритием молекул cAMP и cGMP за связывание со специфической антисывороткой / для cGMP / или с высокоспецифическим связывающим белком / для cAMP /. Концентрации циклических нуклеотидов определяли, используя стандартные калибровочные кривые согласно рекомендациям фирмы "Amersham Inc.". Для всех линий клеток каждый вариант опыта повторяли не менее 3-х раз.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Очистка трансформирующего фактора роста β - типа

Получение высокоочищенных препаратов ТФР- β до сих пор является сложной проблемой, для решения которой необходимо привлечение значительных средств и времени. Принимая во внимание недостаточную эффективность используемых методов, нами усовершенствован один из них для получения ТФР- β из тромбоцитов свиньи. При этом выход препарата был приблизительно в 10 раз выше, чем в других работах по очистке ТФР- β из тромбоцитов / Assoian R. K. et al. 1983, Assoian R. K. et al. 1985 . Такой результат был достигнут благодаря использованию более щадящих режимов обработки препарата ТФР- β в процессе очистки и благодаря оптимизации условий гельфильтрации препарата ТФР- β на колонках с биогелями Р-типа.

Тромбоциты свиньи подвергали кислото - этанольной экстракции и полученный экстракт фракционировали на колонке, заполненной Акрилексом Р-30. В этих условиях ТФР- β элюируется с колонки 1 М CH_3COOH в зоне элюции белков с молекулярной массой 10 - 14 кДа. Такая задержка вызвана его сорбцией частицами Акрилекса. Фракции с активностью ТФР- β мы концентрировали частичной лиофилизацией и наносили на колонку с Акрилексом Р-60, используя в качестве элюента 7 М мочевины в 1 М CH_3COOH . В этих условиях сорбция ТФР- β на частицах геля устраняется. Препарат ТФР- β , полученный таким образом, по данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия имеет чистоту более 95 %.

Полученный нами препарат теряет свою активность после воздействия протеиназа (трипсина или пепсина), дитиотрейтола, мало чувствителен к прогреванию при 56 $^{\circ}$ 30 мин или 100 $^{\circ}$ 3 мин, а также не конкурирует с ЭФ за связывание последнего со специфическими рецепторами ЭФ на клетках линии А-431. Препарат ТФР- β блокирует также цитотоксическое действие фактора некроза опухолей на клетки линии L-929.

Очистка ТФР-β из тромбоцитов свиньи

этапы очистки	белок {мг}	ЕД ₅₀ ⁺ {нг/мл}	общая ++ активность	степень очистки	выход {%}
тромбоциты	1.0x10 ⁵	-	-	-	-
кислотно- этанольный экстр. из тромбоцитов	5.0x10 ³	1.0x10 ³	5.0x10 ⁵	1.0	100
Биогель Р-30 {1 М СН ₃ СООН}	2.0x10 ²	45.0	4.4x10 ⁵	25.0	88.9
Биогель Р-30 {1 М СН ₃ СООН, 7 М мочевиная}	1.0	0.5	2.0x10 ⁵	5.0x10 ³	40.0

+ - ЕД₅₀ равна концентрации ТФР-β при которой достигается его полумаксимальный эффект в ЭФР - зависимой стимуляции колониеобразования в полужидком агаре клеток линии NIH-3T3

++ - Условные единицы, определяли как отношение белок {мг}/ЕД₅₀ {нг/мл}

ЕД₅₀ этого препарата в опытах по стимуляции колониеобразования клеток линий NRK-49F, NIH-3T3, Swiss-3T3 составляет 0.5 нг/мл, 0.5 нг/мл и 1.0 нг/мл соответственно. ТФР-β ингибирует колониеобразование клеток линии А-549 / ЕД₅₀ - 0.1 нг/мл / и пролиферацию в монослое клеток линий А-549 / ЕД₅₀ - 0.5 нг/мл / и ССL-64 / ЕД₅₀ - 0.1 нг/мл /. Это соответствует полумаксимальным эффективным концентрациям препаратов ТФР-β, полученных другими исследователями.

2. Влияние ТФР- β и его комбинаций с ЭФР и инсулином на субстратазависимую пролиферацию клеток

При изучении регуляции субстратазависимой пролиферации клеток нами показано, что направленность и выраженность действия ТФР- β в большей мере зависит от условий культивирования клеток, чем от их типа. Установлено, что действие ТФР- β зависит от концентрации сыворотки крови, времени инкубации клеток в присутствии факторов роста, плотности клеточного монослоя, присутствия ЭФР и инсулина.

Так, в среде с 10 % СЭП ТФР- β в концентрации 50 нг/мл ингибирует включение ^3H -тимидина в ДНК клеток линии NRK-49F в монослое, причем в присутствии ЭФР или инсулина ингибирующее действие ТФР- β проявляется при более низких концентрациях, равных 0.5 и 0.05 нг/мл соответственно. При более низком содержании сыворотки в среде { 0.1 % } ТФР- β дозозависимо стимулирует биосинтез ДНК в этих клетках, инкубируемых в течение 24 часов, но при увеличении времени инкубации до 86 часов этот эффект практически не проявляется /Рис. 1а/.

При продолжительной инкубации /86 часов/ ТФР- β в концентрации 0.5 - 5.0 нг/мл в присутствии инсулина снижает уровень биосинтеза ДНК в клетках линии NRK-49F. Вместе с тем, при совместном действии ТФР- β с ЭФР и инсулином в течение 48 или 86 часов проявляется дозозависимое увеличение интенсивности биосинтеза ДНК.

Ван Зоелен и сопр. /van Zoelen E. J. et al. 1988/ также отмечали стимуляцию включения меченого тимидина в ДНК клеток линии NRK-49F при действии ТФР- β , ЭФР и инсулина, но наши данные свидетельствуют о том, что выраженность этого эффекта, как и эффекта от действия самого ТФР- β зависит от продолжительности инкубации клеток в его присутствии и концентрации ТФР- β . По-видимому, такая зависимость характерна для ТФР- β , поскольку инсулин или ЭФР, хотя и в разной степени, в большинстве случаев стимулируют пролиферацию клеток

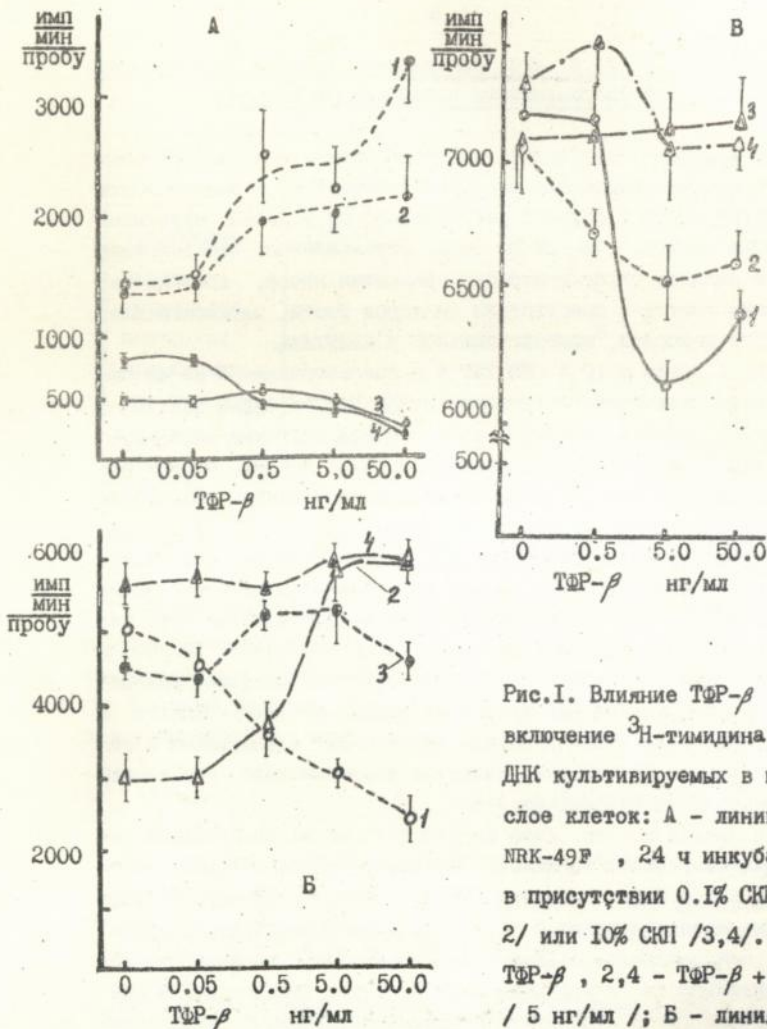


Рис.1. Влияние ТДР-β на включение ³H-тимидина в ДНК культивируемых в моно-слое клеток: А - линии NRK-49F , 24 ч инкубации в присутствии 0.1% СКП /1, 2/ или 10% СКП /3,4/. 1,3 - ТДР-β , 2,4 - ТДР-β + ЭФР / 5 нг/мл /; В - линия

клеток Swiss-3T3 , 24 ч инкубации в присутствии 0.1% СКП при плотности посева 5 тыс.клет./см² /1,2/ или 5 тыс.клет./см² /3,4/, 1,3 - ТДР-β + ЭФР, 2,4 - ТДР-β + инсулин / 1 мкг/мл /;

В - линия клеток А-549, 24 ч инкубации в присутствии 10% СКП.

1 - ТДР-β, 2 - ТДР-β + ЭФР, 3 - ТДР-β + инсулин, 4 - ТДР-β + ЭФР + инсулин.

линии NRK-49F, независимо от времени инкубации.

Известно, что плотность посева клеток в монослое в определенной мере отражает степень непосредственных контактов между клетками. А это, в свою очередь, может влиять на чувствительность клеток к тем или иным биорегуляторам / Никольский Н. Н. 1984/. Мы обнаружили, что при редком посеве { 5 тыс. клеток/см² } сам ТФР-β не влияет на интенсивность биосинтеза ДНК, а в присутствии ЭФР ингибирует его. При тестировании клеток этой линии, находящихся в плотном монослое { 50 тыс. клеток/см² }, сам ТФР-β также не влияет на биосинтез ДНК, однако отмечается стимуляция пролиферации под действием ТФР-β в концентрации 0.5 - 5.0 нг/мл совместно с ЭФР /Рис.16/. Такой синергии в действии ТФР-β и ЭФР имеет место только при высокой плотности посева клеток линии Swiss-3T3, что может быть связано с блокированием ТФР-β контактного ингибирования и, соответственно, проявлением стимулирующего действия ЭФР.

При одновременном действии ТФР-β, ЭФР и инсулина биосинтез ДНК в клетках линии Swiss-3T3 ингибируется независимо от плотности посева клеток, хотя в редкой культуре это ингибирование происходит при концентрации ТФР-β 0.05 нг/мл, а в плотном монослое - при 5.0 нг/мл. Ростингибирующее действие этих трех факторов роста сохраняется и после снижения концентрации СКП до 6.5 %. В таких условиях наблюдается стимуляция включения ³H-тимидина в ДНК клеток под действием ТФР-β и инсулина и ингибирование включения радиоактивной метки в ДНК под действием ТФР-β и ЭФР.

Таким образом, полученные нами результаты могут объяснить, почему разные авторы обнаруживали разные биологические эффекты ТФР-β - ингибирование, отсутствие эффекта или стимуляцию пролиферации клеток под действием этого фактора. По-видимому, источником этих расхождений является недостаточный охват возможных вариантов опытов в тест-системах с использованием ТФР-β.

Обнаружено, что ТФР-β не влияет на интенсивность биосинтеза ДНК в клетках линии NIH-3T3, культивируемых в присутствии 10 % или 6 % СКП в течение 24 часов. После уве-

личения времени инкубации этих клеток до 48 часов в присутствии 6 % СКП отмечено ингибирование этого процесса под действием ТФР- β в присутствии ЭФР или инсулина и его стимуляция - в присутствии обоих факторов - ЭФР и инсулина. При инкубации клеток в течение 72 часов ростингибирующий эффект ТФР- β в присутствии инсулина, а также стимуляция роста клеток под действием ТФР- β в присутствии ЭФР и инсулина менее выражены. Кроме того, наблюдается ингибирование включения ³H-тимидина в ДНК клеток линии N1H-3T3 в присутствии ТФР- β и ЭФР. После снижения концентрации сыворотки крови в среде до 0.1 % стимуляция пролиферации клеток имеет место только при одновременном действии на них ТФР- β , ЭФР и инсулина.

Иной характер действия ТФР- β на пролиферацию обнаружен нами при исследовании клеток линии А-549, полученных из аденокарциномы легких человека /Рис. 1в/. ТФР- β ингибирует биосинтез ДНК в этих клетках при их инкубации в течение 24 часов в присутствии 10 % СКП. Аналогичные результаты получены и другими авторами /Fernandez-Pol J. A. et al. 1986/. По-видимому, этот ингибирующий эффект является следствием взаимодействия ТФР- β с факторами роста, имеющимися в сыворотке крови. Эти факторы роста должны быть в определенных соотношениях, поскольку нами обнаружено, что добавление ЭФР снижает ингибирующее влияние ТФР- β на биосинтез ДНК, а инсулин полностью устраняет его /Рис. 1в/.

После снижения концентрации СКП в среде до 7.5 % ингибирование включения метки в ДНК клеток линии А-549 под действием ТФР- β наблюдается только в присутствии ЭФР. При концентрации СКП в культуральной среде 0.1 % наблюдается уже стимуляция биосинтеза ДНК в клетках под действием ТФР- β /0.5 нг/мл / и ЭФР, а также ТФР- β , ЭФР и инсулина.

3. Влияние ТФР- β и его комбинаций с ЭФР и инсулином на субстратнезависимую пролиферацию клеток

ТФР- β был впервые выявлен как фактор, стимулирующий субстратнезависимую пролиферацию клеток, полученных из нормальных тканей /Roberts A. B. et al. 1983/. Такая пролифера-

ция является характерным фенотипическим признаком трансформированных и опухолевых клеток. В дальнейших работах было показано, что действие ТФР- β может быть не только стимулирующим, но и ингибирующим /Lee K. et al. 1987, Laiho M. et al. 1987/. Однако, неизвестно, от каких факторов зависит характер действия ТФР- β на фенотипическую трансформацию клеток.

Изучая влияние ТФР- β на проявление трансформированного фенотипа, мы исследовали колониеобразование в полужидком агаре разных линий клеток, полученных из нормальных тканей {NRK-49F, NIH-3T3, Swiss-3T3}, из опухолей мезенхимального {HT-1080, П-103 клоны 384/5 и 3сб} и из опухоли эпителиального происхождения {A-549}, а также клеток, трансформированных *in vitro* {CHO-719с/3}.

Обнаружено, что сам ТФР- β не влияет на уровень колониеобразования клеток, полученных из нормальных тканей, но в присутствии ЭФР /5 нг/мл/ он дозозависимо стимулирует пролиферацию в полужидком агаре. Подумаксимальная эффективная концентрация ТФР- β составляет 0.5 нг/мл для клеток линий NRK-49F и NIH-3T3, 1.0 нг/мл - для клеток линии Swiss-3T3. Показано, что при совместном действии ТФР- β в больших концентрациях /50 нг/мл/ и ЭФР колониеобразование клеток линии NIH-3T3 меньше, чем при действии ТФР- β в меньших концентрациях. Присутствие инсулина /1 мкг/мл/ не влияет на действие ТФР- β на колониеобразование клеток линий NRK-49F и Swiss-3T3. При совместном действии ТФР- β с ЭФР и инсулином на клетки линии NRK-49F результат такой же, как и в присутствии самого ЭФР. У клеток линии Swiss-3T3 инсулин усиливает действие ТФР- β с ЭФР по стимуляции колониеобразования, а у клеток линии NIH-3T3 он значительно уменьшает стимулирующий эффект совместного действия ТФР- β и ЭФР /Рис. 2а/.

Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что стимуляция колониеобразования у клеток, полученных из нормальных тканей, происходит при действии ТФР- β в присутствии

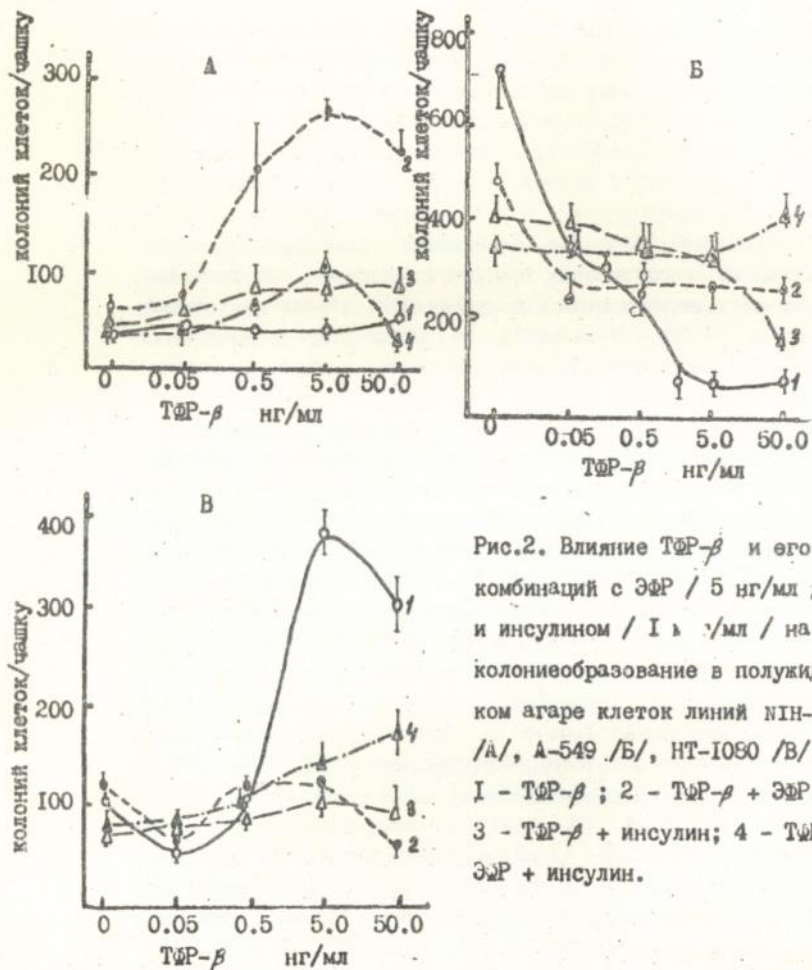


Рис.2. Влияние ТФР- β и его комбинаций с ЭФР / 5 нг/мл / и инсулином / I μ /мл / на колониеобразование в полужидком агаре клеток линий N1H-3T3 /А/, А-549 /Б/, NT-1090 /В/.
 1 - ТФР- β ; 2 - ТФР- β + ЭФР;
 3 - ТФР- β + инсулин; 4 - ТФР- β + ЭФР + инсулин.

ЭФР. В то же время, у трансформированных *in vitro* клеток линии CHO-719с/3 такая стимуляция наиболее выражена при совместном действии ТФР- β и инсулина. А добавление ЭФР ведет к снижению уровня колониеобразования, индуцированного ТФР- β .

О том, что ТФР- β играет важную роль в процессах развития

опухолей, свидетельствуют результаты тестирования клеток, полученных из новообразований. Так, у клеток линии А-549, полученных из аденокарциномы легких человека, сам ТФР-β вызывает почти 90 % ингибирование колониеобразования. Этот ингибирующий эффект ТФР-β частично устраняется ЭФР и инсулином /Рис. 2б/. В то же время нами показано, что ЭФР и инсулин существенно уменьшают стимулирующий эффект ТФР-β на пролиферацию клеток, полученных из опухоли другого типа - фибросаркомы человека (линия HT-1080) /Рис. 2в/. Таким образом, направленность рострегулирующего действия ТФР-β зависит и от типа опухолей, из которых получены клетки-мишени.

Полученные нами данные позволяют предположить, что направленность действия ТФР-β на субстратнезависимую пролиферацию клеток, полученных из опухолей в значительной мере определяется не только происхождением опухоли, но и характеристиками клонирования клеток в полужидких средах. Так, обнаружено, что ТФР-β ингибирует колониеобразование клеток линии HT-1080, но при этом коэффициент спонтанного клонирования этих клеток был выше, чем в наших опытах /Laiho M. et al. 1987/. Такая же зависимость направленности действия ТФР-β от уровня спонтанного колониеобразования обнаружена нами для клеток линии ПС-103 /клон 384/5/, полученных из мышинной саркомы. В тех случаях, когда использовали клетки с низким уровнем спонтанного колониеобразования, действие ТФР-β оказывается стимулирующим. При тестировании клеток с высоким уровнем спонтанного колониеобразования ТФР-β вызывает его дозозависимое ингибирование. В то же время, у клеток другого клона /Зсб/ этой же линии ПС-103, характеризующегося высоким уровнем спонтанного колониеобразования, наблюдается стимуляция пролиферации под действием ТФР-β в присутствии ЭФР и инсулина.

Таким образом, ТФР-β стимулирует в присутствии ЭФР колониеобразование у псевдонормальных клеток или не влечет на него. В то же время у клеток, полученных из опухолей, картина не столь однозначна. Можно предположить, что направленность действия ТФР-β на колониеобразование опухолевых клеток в большей мере зависит от особенностей клонирования

этих клеток в полужидкой среде, чем от типа опухоли. При этом эффект ТФР- β сильно зависит от присутствия других факторов роста.

4. Характеристика специфического связывания ТФР- β клетками

Одним из первых этапов в механизмах действия ТФР- β , в котором может осуществляться регуляция его действия, является рецепция ТФР- β клетками-мишенями /Like B. et al. 1986., Massaue J. et al. 1985/. Поэтому нами проведено изучение лиганд-связывающих характеристик специфических рецепторов ТФР- β , включая их понижающую регуляцию /down regulation/, кооперативность и трансмодуляцию.

Используя полученный нами ^{125}I -ТФР- β , мы провели идентификацию специфических рецепторов ТФР- β на клетках линии NRK-49F, используя ковалентную сшивку лиганда с рецептором дисульфидными субератами с последующим электрофоретическим разделением белков в полиакриламидном геле и автордиографией. Показано, что основная часть специфично связанного ^{125}I -ТФР- β обнаруживается в зоне миграции белков с Mr 260 - 280 кДа. Наблюдается также слабое специфичное связывание ^{125}I -ТФР- β белками с относительными молекулярными массами 60 и 90 кДа. Полученные нами результаты соответствуют данным, известным из других работ о молекулярной массе специфических рецепторов ТФР- β /Frolik S. et al. 1984, Segarini P. et al. 1988/.

Нами показано, что у клеток линии NRK-49F после их инкубации с немеченым лигандом имеет место понижающая регуляция рецепторов ТФР- β , которая за 2 часа достигает 47% от общего уровня специфического связывания ^{125}I -ТФР- β клетками. Следует подчеркнуть, что величине понижающей регуляции близка к таковой, полученной исследователями для других линий клеток: A-549 - 30%, AKR-2B - 64-76% /Tucker R. F. et al. 1984/. Можно предположить, что понижающая регуляция рецепторов ТФР- β в диапазоне от 30% до 70% характерна для механизмов регуляторного влияния ТФР- β и непосредственно не зависит от направленности действия этого фактора на проли-

ферацию клеток.

Интересно, что связывание ^{125}I -ТФР- β клетками линии NRK-49F снижается также под действием холерного токсина /10нг/мл/ и $\alpha 2$ /макроглобулина /3мкг/мл/. Если эффект $\alpha 2$ /макроглобулина может быть объяснен образованием клренсных комплексов ТФР- β с этим белком /Huang S.S. et al. 1988/, то действие холерного токсина, по-видимому, связано с его влиянием на функциональную активность G-белков, а через них и на специфичное связывание ТФР- β клетками /Murthy U.S. et al. 1988/.

Из полученных нами данных следует, что диссоциация ^{125}I -ТФР- β из его связи с клеточными рецепторами зависит от степени их насыщения лигандом. При насыщении более 20% от общего числа рецепторов ТФР- β их сродство к лиганду изменяется так, что общий уровень специфичного связывания ^{125}I -ТФР- β снижается на 15%. Эти данные предполагают наличие отрицательной кооперативности рецепторов ТФР- β .

Понижающая регуляция и отрицательная кооперативность рецепторов ТФР- β у клеток линии NRK-49F приводят к тому, что общий уровень специфичного связывания ТФР- β у клеток этой линии при действии лиганда в больших концентрациях будет более, чем на 50% ниже, чем при действии ТФР- β в концентрациях 1-10 нг/мл. Поскольку действие ТФР- β на пролиферацию клеток проявляется при его концентрациях менее 10 нг/мл, то очевидно, что понижающая регуляция и отрицательная кооперативность приводят к защите клеток от образования избыточно-го количества лиганд-рецепторных комплексов.

Большой интерес при изучении механизмов действия ТФР- β представляет влияние других полипептидных факторов роста на специфичное связывание ТФР- β , то есть трансмодуляция рецепторов ТФР- β /Sporn M.B. et al. 1988/. Нами изучено влияние ЭФР и инсулина на количество рецепторов ТФР- β и их K_d у клеток линий NRK-49F и А-549. Клетки этих двух линий образны в связи с разным характером действия ТФР- β на их пролиферацию. Как уже упоминалось, клетки линии NRK-49F стимулируются этим фактором в присутствии ЭФР, а клетки линии А-549 - ингибируются самим ТФР- β .

АНБ Ин. В. Стефанова
АН УРСР

Данные, приведенные в табл. 2, рассчитаны на основании результатов радиорецепторного анализа по методу Скэтчарда. Видно, что количество рецепторов ТФР-β у клеток линии NRK-49F уменьшается под действием ЭФР и инсулина, хотя в присутствии самого ЭФР оно достоверно не изменяется, а в присутствии самого инсулина - увеличивается. K_d рецепторов ТФР-β в названных вариантах опыта достоверно не изменяется. При изучении клеток линии А-549 обнаружено, что ЭФР вызывает увеличение количества рецепторов ТФР-β, а инсулин и его смесь с ЭФР достоверно не влияют на него. В этом случае K_d рецепторов ТФР-β также достоверно не изменяется. Вероятно, первым этапом в изменении характеристик связывания ТФР-β клетками, изменяющими свой статус, является изменение количества центров связывания, но не сродства к лиганду.

табл. 2

Влияние ЭФР и инсулина на специфическое связывание ^{125}I -ТФР в клетках линий NRK-49F и А-549.

варианты опытов	NRK-49F		А-549	
	к-во рецепт. на клетку	K_d /пМ/	к-во рецепт. на клетку	K_d /пМ/
связыв. ТФР-β без ИФР	49300±3000	27.3±3.0	9700±700	27.0±6.0
ТФР-β +ЭФР	40900±6000	24.3±5.0	21600±900	32.7±8.0
ТФР-β +инсул.	61200±3000	23.7±11.0	13700±600	32.0±6.0
ТФР-β +ЭФР + инсул.	31300±4000	23.6±6.0	14400±1100	27.2±7.0

Сопоставление результатов изучения трансмодуляционных изменений специфического связывания ТФР-β и данных о его влиянии на пролиферацию клеток свидетельствует о том, что стимулирующее действие ТФР-β в присутствии ЭФР на субстратне-

зависимую пролиферацию клеток линии NRK-49F сопровождается снижением количества рецепторов ТФР- β , а частичное блокирование ингибирующего действия ТФР- β на пролиферацию клеток линии А-549 под влиянием ЭФР сопровождается повышением количества рецепторов ТФР- β .

В целом, полученные нами результаты изучения понижающей регуляции, кооперативности и трансмодуляции рецепторов ТФР- β предполагают, что уже на этапе рецепции ТФР- β клетками действуют механизмы, которые могут определять характер его влияния на эти клетки-мишени.

5. Влияние ТФР- β и его комбинаций с ЭФР и инсулином на содержание сАМР и сGMP в клетках

Одной из клеточных регуляторных систем, которые могут быть задействованы в действии гормонов и полипептидных факторов роста на клетки-мишени, являются сАМР- и сGMP-зависимые процессы /Северин С. Е. и др. 1979/. Исходя из этого, мы изучали изменение содержания сАМР и сGMP в клетках и определяли отношение внутриклеточных концентраций этих нуклеотидов под действием ТФР- β , а также инсулина и ЭФР. Для сравнения использовали клетки линий NRK-49F и N1H-3T3, полученные из нормальных тканей, и клетки линии А-549, полученные из опухоли.

Обнаружено, что при инкубации клеток линии А-549 в бесывороточной среде ТФР- β снижает внутриклеточное содержание сАМР, причем, это действие не блокируется циклогексимидом. ТФР- β также снижает стимулирующее влияние ЭФР на содержание сАМР в клетках. В присутствии инсулина содержание сАМР снижается, а после добавления еще и ТФР- β оно повышается в 1.3 раза по сравнению с таковым у клеток, инкубируемых в бесывороточной среде. Совместное действие ТФР- β , ЭФР и инсулина индуцирует уменьшение содержания сАМР в клетках. При определении содержания сGMP в клетках линии А-549 обнаружено, что ТФР- β во всех вариантах опыта вызывает его уменьшение.

При использовании клеток линии N1H-3T3 также обнаружено

снижение внутриклеточного содержания cGMP под действием ТФР-β, независимо от присутствия ЭФР или инсулина. ТФР-β сам или в присутствии ЭФР снижает содержание cAMP в этих клетках. После добавления инсулина, который вызывает уменьшение содержания cAMP, эффект ТФР-β не обнаруживается. Циклогексимид не блокирует влияния ТФР-β на содержание cAMP в клетках линии NIH-3T3 в присутствии ЭФР. Представляет интерес тот факт, что ТФР-β, независимо от присутствия ЭФР и инсулина, вызывает увеличение величины отношения [cAMP]/[cGMP] /табл. 3/. Такой эффект может свидетельство-

табл. 3

Влияние ТФР-β и его комбинаций с ЭФР и инсулином на величину отношения содержания cAMP и cGMP в клетках разных линий

линия клеток	[cAMP]/[cGMP]								
	3.4	3.6	2.1	2.4	0.7	1.3	1.6	1.6	0.4
A 142	27.0	31.6	98.0	237.0	35.5	37.4	33.0	46.0	1.0
NRK-49F	103.7	180.0	250.0	20.9	43.2	83.3	5.7	0.3	21.6
NRK-49F + хол. таблетки	107.1	91.4	115.2	13.2	-	-	-	103.3	-
ТФР-β		+		+		+		+	
ЭФР			+	+			+	+	
инсулин					+	+	+	+	
20% СКП									+

вать о том, что действие ТФР-β на систему регуляции содержания циклических нуклеотидов опосредуется механизмами, непосредственно не перекрывающимися с механизмами действия ЭФР и инсулина.

У клеток линии NRK-49F характер изменений содержания циклических нуклеотидов под влиянием факторов роста отличается от такового, наблюдаемого у клеток линий A-549 и NIH-3T3. Так, сам ТФР- β вызывает снижение внутриклеточной концентрации cAMP и cGMP, но под действием ЭФР она повышается. ТФР- β в присутствии инсулина увеличивает содержание cAMP и снижает содержание cGMP. При действии ТФР- β совместно с ЭФР и инсулином содержание cAMP в клетках линии NRK-49F резко снижается. В клетках этой линии ТФР- β вызывает увеличение отношения [cAMP]/[cGMP] сам или при совместном действии с инсулином, а в присутствии ЭФР ТФР- β вызывает резкое снижение величины этого соотношения.

Показано, что ТФР- β снижает отношение внутриклеточных концентраций [cAMP]/[cGMP] в клетках линии NRK-49F, культивируемых в присутствии холерного токсина. Необходимо отметить, что даже повышение содержания cAMP в клетках данной линии под действием холерного токсина не ликвидирует снижения содержания циклического нуклеотида, обнаруживаемого после действия ТФР- β в комбинациях с ЭФР и инсулином.

Таким образом, можно заключить, что влияние ТФР- β , ЭФР и инсулина на содержание циклических нуклеотидов зависит от типа используемых клеток. Тот факт, что ТФР- β практически в большинстве вариантов опытов вызывает увеличение отношения [cAMP]/[cGMP] может свидетельствовать об активации этим фактором универсального механизма изменения содержания циклических нуклеотидов в клетках разных типов. Из результатов наших исследований видно, что отношение [cAMP]/[cGMP] увеличивается в ряду клеток линий A-549 < NIH-3T3 < NRK-49F. Такой характер изменения отношения внутриклеточных концентраций cAMP и cGMP может определяться типом клеток. Как уже отмечалось, клетки линии A-549 получены из опухоли, клетки линии NIH-3T3 - из эмбриона, а клетки линии NRK-49F - из нормальной ткани сформированного органа взрослого животного.

При сопоставлении результатов влияния ТФР- β , а также его комбинаций с ЭФР и инсулином, на содержание циклических нуклеотидов в клетках и его действия на интенсивность субстратзависимой и субстратнезависимой пролиферации клеток

выявлено, что чем выше пролиферативная активность клеток линий A-549 и NRK-49F в полужидкой среде, тем меньше величина отношения $[cAMP]/[cGMP]$. В то же время у клеток линии NIH-3T3 мы наблюдаем обратную картину, а именно при увеличении колониеобразования клеток увеличивается и величина отношения $[cAMP]/[cGMP]$. Что касается субстратазависимой пролиферации клеток, то не было обнаружено прямой зависимости между изменением внутриклеточного содержания этих циклических нуклеотидов под действием ТФР- β и его комбинаций с ЭФР и инсулином и интенсивностью пролиферации клеток. Исходя из приведенных результатов, можно предположить, что важную роль в определении характера действия ТФР- β на проявление трансформированного фенотипа играют не столько абсолютные концентрации циклических нуклеотидов, сколько величина их отношения - $[cAMP]/[cGMP]$.

Таким образом, выявленные нами изменения в функционировании систем реакции ТФР- β клетками и регуляции внутриклеточного содержания cAMP и cGMP, позволяют считать, что определение характера действия ТФР- β на пролиферацию клеток может осуществляться на уровне этих двух регуляторных систем клеток.

ВЫВОДЫ

1. Усовершенствован метод выделения и очистки ТФР- β из тромбоцитов крови свиньи, степень гомогенности полученного препарата превышает 95%.

2. Показано, что влияние ТФР- β на пролиферацию клеток, культивируемых в монослое зависит не только от типа клеток-мишеней, но и от наличия в среде ЭФР или инсулина, времени инкубации клеток, плотности их посева на единицу площади субстрата и от концентрации сыворотки крови в среде. Действие ТФР- β на пролиферацию в зависимости от микроокружения клеток может быть стимулирующим или ингибирующим.

3. ТФР- β дозозависимо стимулирует проявление трансформированного фенотипа у клеток, полученных из нормальных тканей /линии NRK-49F, NIH-3T3, Swiss-3T3/ только в присутствии ЭФР. Обнаружено, что инсулин усиливает /клетки линии

Swiss-3T3/ или ингибирует /клетки линии NIH-3T3/ это стимулирующее действие ТФР- β и ЭФР.

4. ТФР- β оказывает трансформирующее действие на клетки линии СНО-719с/3 в присутствии инсулина, но не ЭФР.

5. ЭФР и инсулин угнетают действие ТФР- β на пролиферацию в полужидких средах клеток, полученных из равных опухолей человека. Эти факторы уменьшают выраженность ростстимулирующего действия ТФР- β на клетки линии HT-1080 из фибросаркомы и ростингибирующее действие ТФР- β на клетки линии А-549 из аденокарциномы.

6. Действие ТФР- β на проявление трансформированного фенотипа у клеток мышинной саркомы линии ПС-103 (клон 384.5) зависит от уровня их спонтанного колониеобразования: при низком уровне наблюдается стимуляция, а при высоком - ингибирование пролиферации.

7. Идентифицированы специфические рецепторы ТФР- β у клеток линии NRK-49F. Показано, что инсулин увеличивает, а ЭФР не изменяет их количества на поверхности этих клеток. При совместном действии ЭФР и инсулин уменьшают количество рецепторов ТФР- β . У клеток линии А-549 ЭФР вызывает повышение уровня этих рецепторов. Во всех случаях изменения в связывании ТФР- β происходит без существенного изменения K_d его рецепторов.

8. Для клеток линии NRK-49F выявлена понижающая регуляция (down regulation) специфического связывания ТФР- β и отрицательная кооперативность рецепторов ТФР- β при связывании специфического лиганда.

9. ТФР- β индуцирует снижение содержания cAMP и cGMP в клетках линий А-549, NIH-3T3 и NRK-49F. Обнаружено, что отношение внутриклеточного содержания [cAMP]/[cGMP] в большинстве случаев увеличивается, несмотря на то, что исходные концентрации этих циклических нуклеотидов в данных клетках существенно различаются. Влияние ТФР- β на содержание циклических нуклеотидов в клетках зависит от присутствия ЭФР и инсулина в культуральной среде.

10. Анализ полученных данных показывает, что понижающая регуляция, отрицательная кооперативность и трансмодуляция

рецепции ТФР- β клетками изменяют чувствительность клеток к действию ТФР- β . Системы рецепции ТФР- β и регуляции внутриклеточного содержания циклических нуклеотидов могут играть роль в определении направленности влияния ТФР- β на пролиферацию клеток.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Сушельницький С. І., Стойка Р. С., Гарасько С. Я. Часткова очистка та деякі властивості β -типу трансформуючого фактора росту тромбоцитів свині // Український біохім. вісн: Тез. доп. / Івано-Франк., вересень 1987р. / - Київ, Наукова думка, 1987 - ч. 2. - с. 249.
2. Стойка Р. С., Федішин Я. Я., Сушельницький С. І. Поліпептидні фактори росту в ранньому ембріогенезі та при аляокісній трансформації клітин // Український біохім. вісн: Тез. доп. / Івано-Франк., вересень 1987р. / - Київ, Наукова думка, 1987 - ч. 1. - с. 149-150.
3. Стойка Р. С., Федішин Я. Я., Сушельницький С. І., Гарасько С. Я., Микитюк Р. Г. Полипептидные факторы роста в раннем эмбриогенезе животных // Всесоюзный симп. "Молекулярные и функциональные механизмы онтогенеза", 27-29 жовтня 1987г., Харків. - Вид. Харк. держ. унів., 1987 - с. 172-173.
4. Stoiko R. S., Suchelnitsky S. I., Kusen S. I. The influence of transforming growth factor - β , epidermal growth factor and insulin on cell proliferation in the media with semisolid agar // Abstr. of 4th International Congress of cell biology, Montreal, 1988. - p. 108.
5. Стойка Р. С., Сушельницький С. Я., Кусень С. Я. Влияние трансформирующего фактора роста - β , эпидермального фактора роста и инсулина на пролиферацию клеток в среде с полужидким агаром // Биополимеры и клетка., 1989 - т. 5 - №1 - с. 96-99.
6. Сушельницький С. Я., Стойка Р. С., Гарасько С. Я., Шафранская Г. И., Кусень С. Я. Влияние трансформирующего фактора роста β -типа и его комбинаций с эпидермальным фак. роста и инсулином на субстратнезависимую пролиферацию нормальных и с /холодовых клеток // Цитология., 1989 - т. 31 - №7 - с. 767-774.
7. Стойка Р. С., Сушельницький С. Я., Кусень С. Я. Регуляторное влияние трансформирующего фактора роста β на пролиферацию кле-

- ток в зависимости от условий тестирования его активности // Всесоюзное совещание «Актуальные вопросы клеточной биологии»: Тез. докл. (Ленинград, 17—19 окт. 1989 г.). — Цитология, 1989 — т. 31 — № 9 — с. 1127—1128.
8. Сушельницкий С. И., Стойка Р. С. Изучение влияния эпидермального фактора роста и инсулина на специфическое связывание трансформирующего фактора роста β нормальными и опухолевыми клетками // Всесоюз. сов. «Актуальные вопросы клеточной биологии»: Тез. докл. (Ленинград, 17—19 окт. 1989 г.). — Цитология, 1989 — т. 31 — № 9 — с. 1129.
9. Стойка Р. С., Сушельницкий С. И., Кусень С. И. Влияние трансформирующего фактора роста β на интенсивность синтеза ДНК клеток в зависимости от их типа и условий культивирования // Цитология, 1990 — т. 32 — № 2 — с. 132—139.
10. Стойка Р. С., Сушельницкий С. И., Кусень С. И. Особенности регуляторного действия трансформирующего фактора роста — β // В сборн. «Морфогенетически активные вещества»: под. ред. Шейман И. М. — Пущино: Изд. науч. центра биол. исследований. 1990 — с. 107—113.
11. Stoika R. S., Sushelnitsky S. I., Kusen S. I. The regulation of proliferation of human lung carcinoma cells of A-549 line by autocrine factors // Abstr. of 20th FEBS Meeting, Budapest, 23 11 1990, — p. 300.
12. Sushelnitsky S. I., Stoika R. S., Kusen S. I. The regulation of specific binding of transforming growth factor β by NRK-49 cells // Abstr. of 20th FEBS Meeting, Budapest, 23 11 1990, — p. 303.
13. Сушельницкий С. И., Стойка Р. С., Кусень С. И. Влияние эпидермального фактора роста и инсулина на специфическое связывание трансформирующего фактора роста β клетками линий NRK-49F и A-549 // Цитология, 1991 — т. 33 — № 3 — с. 80—88.
14. Сушельницкий С. И., Стойка Р. С. Определение кинетических параметров специфического связывания трансформирующего фактора роста β клетками линии NRK-49F из нормальной почки крысы // Биологические мембраны 1991 — т. 8 — № 6 — с. 628—632.

Подписано к печ. 17.01.92. Формат 60×84/16. Печать офсет. Бумага офсет. Усл. п. л. 1,4. Усл. кр.-отт. 1,64. Уч.-изд. л. 1,0. Тираж 100 экз. Бесплатно. Зак. 2065.

Областная книжная типография, 230000, Львов, ул. Стефаника, 11.

466881

ТРАНСФОРМИРУЮЩИЙ ФАКТОР РОСТА β -типа /ТФР- β / - полипептидный фактор роста с уникальным биорегуляторным действием.

- in vitro*: - ингибирование пролиферации большинства клеток, полученных из нормальных тканей и опухолей
- стимуляция пролиферации некоторых клеток, полученных из нормальных тканей
 - регуляция дифференцировки /клетки, полученные из эпителия, печени, мышечной и костной ткани/, мезодермальная индукция
 - регуляция биосинтеза и/или секреции белков матрикса и цитоскелета, других клеточных белков
 - регуляция биосинтеза и секреции протеиназ и их ингибиторов
 - регуляция транспорта аминокислот, Ca^{++} , глюкозы, регуляция гликолиза
 - влияние на обмен фосфатидинозитолов, на активность аденилатциклазной активности
 - регуляция экспрессии генов: урокиназы, цитоскелетных и матриксных белков, рецептора ЭФР, c-myc, c-sis, c-ras, c-fos, c-erb

in vivo принимает участие в процессах:

- заживление ран мягких тканей
- заживление переломов костей
- ангиогенеза
- эмбриогенеза/дифференцировки тканей
- развития опухолей
- иммунодепрессии

ТФР- β консервативная молекула: у мыши и человека лишь одна аминокислотная замена в первичной структуре /112 АК/; бык, свинья, человек - 100% гомология.

Источник получения: тромбоциты свиньи. Чистота - не менее 95% /ЭФ в ПААГ с ДСNa/, биотестирование на клетках разных линий /CCL-64, NRK-49F, A-549, NIH-3T3, L-929/.

Форма поставки - по желанию заказчика.

Наш адрес: 290005, УКРАИНА, г. Львов-5, ул. Драгоманова 14/16, Львовское отд. Института биохимии АН Украины, "ТФР - НОВА ГЕНЕРАЦИЯ", Сушельницкому С.И., тел. 72-06-46, 72-85-08

[Handwritten signature]



Бесплатно

АВ 25.489

~~92~~

[Handwritten signature]