

АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О. В. ПАЛЛАДИНА

*На правах рукопису*

СТОЙКА  
Ростислав Степанович

**ТРАНСФОРМУЮЧИЙ ФАКТОР РОСТУ  $\beta$   
ТА ЙОГО РОЛЬ У РЕГУЛЯЦІЇ ПРОЛІФЕРАЦІЇ  
КЛІТИН ТВАРИН І ЛЮДИНИ**

03.00.04 — біохімія

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня  
доктора біологічних наук



Робота виконана у відділі біохімії клітинної диференціації Відділення регуляторних систем клітини Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна АН України.

**Офіційні опоненти:** член-кореспондент АН України, доктор біологічних наук ГУЛА Н. М., доктор медичних наук, професор БИКОРІЗ А. П., доктор біологічних наук БЕЗДРОБНИЙ Ю. В.

**Провідна установа** — Інститут молекулярної біології і генетики АН України.

Захист відбудеться « 15 » лютого 1993 р. о 14 год. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 016.07.01 в Інституті біохімії ім. О. В. Палладіна АН України за адресою: 252601, Київ-30, вул. Леонтовича, 9,

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна АН України.

Автореферат розісланий « 6 » чотирьох 1993 г.

*Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради,  
кандидат біологічних наук*

*О. В. КИРСЕНКО*



Загальна характеристика роботи

Актуальність проблеми. Трансформувчий фактор росту  $\beta$  /ТФР- $\beta$ / - це біологічно активний поліпептид, який регулює не лише проліферацію та диференціацію клітин, але й прояв у них деяких фенотипічних ознак трансформації, зокрема здатність рости, незалежно від прикріплення до субстрату-підкладки (Roberts, Sporn, 1985). Він вперше виявлений у 1981 році (Roberts et al., 1981) і очищений у 1983 році (Anzano et al., 1983). ТФР- $\beta$  складається з двох однакових субодиниць з молекулярно масов 12,5 кДа кожна, сполучених між собою дисульфідними зв'язками (Roberts, Sporn, 1985).

Необхідно відзначити, що м-РНК ТФР- $\beta$  та специфічні рецептори цього фактора росту виявлені у клітинах всіх досліджуваних тканин ссавців (Degunck et al., 1985, Boyd et al., 1990). Первинній структурі окремих ізоформ ТФР- $\beta$  хребетних тварин властива висока ступінь консервативності (Massague, 1990). Ці та деякі інші особливості дозволяють припускати, що ТФР- $\beta$  має важливе значення у регуляції клітинних процесів.

Серед функціональних особливостей ТФР- $\beta$  слід, в першу чергу, відмітити його неоднозначний вплив на проліферацію клітин-мішеней. Показано, що даний вплив може бути не лише стимулюючим, але й інгібуючим (Roberts, Sporn, 1985). Ця обставина суттєво ускладнює з'ясування справжньої ролі ТФР- $\beta$  в організмі тварин і людини.

Встановлено, що ТФР- $\beta$  може діяти не лише *in vitro*, але й *in vivo*, як інгібітор проліферації клітин багатьох типів пухлин (Roberts, Sporn, 1985), а також як стимулятор загоєння ран (Pierce et al., 1989) і переломів кісток (Noda, Camilliere, 1989), індуктор розвитку системи кровоносних судин (Roberts et al., 1986) та імуносупресор (Torre-Adriano et al., 1990). Враховуючи ці дані, дослідники піднімають питання про практичне використання ТФР- $\beta$  у медицині (Massague, 1990). Проте реалізація цих планів суттєво гальмується недостатнім вивченням факторів та умов, які впливають на скерованість регуляторного впливу ТФР- $\beta$  на проліферацію клітин різних типів. Молекулярні механізми, за допомогою яких діють інші поліпептидні фактори росту (Ullrich, Schlessinger, 1990), з деяких причин не підходять для пояснення особливостей регуляторної дії ТФР- $\beta$ .

Дослідження, що проводилися раніше з метов вивчити фактори та умови, які впливають на характер дії ТФР- $\beta$  на проліферацію, в більшості випадків обмежувалися одним типом клітин-мішеней і/чи одним регуляторною системою, яка опосередковує дію цього фактора

росту. Тому доцільним є проведення порівняльних досліджень з одночасним використанням кількох типів клітин-мішеней та вивченням у них деяких найбільш важливих регуляторних систем, що локалізовані у різних клітинних компартментах. Без результатів таких досліджень важко робити певні узагальнення про фактори та умови, що визначають характер рістрегулюючої дії ТФР- $\beta$ .

До недавнього часу залишалося незвиченим питання про роль ТФР- $\beta$  в ембріогенезі, оскільки не було прямих експериментальних даних про наявність ТФР- $\beta$  та його специфічних рецепторів у клітинах зародків тварин. Слід відзначити, що такі дослідження з використанням клітин зародків представників такого великого класу хребетних тварин, як риби, зовсім не проводилися.

Накінець, слід згадати і про надзвичайно високу вартість очищених препаратів ТФР- $\beta$ , що робить його недоступним для широкого кола дослідників, які працюють в різних галузях біології та медицини. Тому є вкрай необхідним вдосконалення методів виділення та очистки ТФР- $\beta$  з метою його здешевлення.

Всі ці обставини свідчать про те, що розгортання науково-дослідних робіт, пов'язаних з використанням ТФР- $\beta$ , є актуальним і має не лише теоретичне, але й практичне значення.

Мета та завдання дослідження. Головною метою роботи було:

1. виявити механізми, що можуть визначати скерованість та вираженість регуляторної дії ТФР- $\beta$  на проліферацію нормальних і пухлинних клітин тварин і людини;
2. встановити, чи поліпептидні фактори з біологічними властивостями ТФР- $\beta$  можуть впливати на клітинні функції на початкових етапах ембріонального розвитку тварин.

Для досягнення поставленої мети в роботі ставили такі основні завдання:

1. отримати високоочищений препарат ТФР- $\beta$ ;
2. протестувати нормальні, трансформовані та пухлинні клітини різного походження з метою виявлення клітинних ліній, які найбільш визначено реагують на стимулюючий або інгібуючий вплив ТФР- $\beta$  на клітинну проліферацію;
3. вивчити вплив епідермального фактора росту /ЕФР/ та інсуліну на скерованість та вираженість рістрегулюючої дії ТФР- $\beta$ ;
4. вивчити вплив різних умов культивування клітин на характер їх проліферативної відповіді на дію ТФР- $\beta$ , ЕФР та інсуліну;
5. порівняти особливості функціонування деяких важливих регуляторних систем у клітинах, проліферація яких стимулюється чи інгібується ТФР- $\beta$ ;

6. виділити та частково очистити поліпептидні фактори з властивостями ТФР- $\beta$  із зародків в'яна та встановити наявність специфічних рецепторів ТФР- $\beta$  у зародкових клітинах.

Наукова новизна роботи. Виявлено, що не лише ЕФР, але й інсулін може впливати на здатність ТФР- $\beta$  регулювати проліферацію нормальних і пухлинних клітин тварин і людини. Так, ТФР- $\beta$  діє синергічно з інсуліном при стимуляції субстратнезалежної проліферації клітин лінії СНО-719, що не мають специфічних рецепторів ЕФР.

Показано, що навіть серед клітин одного клону лінії РС-103 саркомної пухлини є такі, що відрізняються за скерованістю їх проліферативної відповіді на дію ТФР- $\beta$ . Одні з цих клітин стимулюються ТФР- $\beta$  до проліферації, тоді як інші - інгібується.

Встановлено, що в умовах субстратзалежного росту клітин на скерованість і вираженість дії ТФР- $\beta$  на біосинтез ДНК суттєво впливає не лише тип клітин-мішеней, але й концентрація ТФР- $\beta$  та сироватки крові в середовищі, наявність в ньому ЕФР і/чи/ інсуліну, тривалість дії факторів росту на клітини та щільність клітин на субстраті-підкладці. Виявлено також відмінність в наслідках дії ТФР- $\beta$  на проліферацію карциномних клітин лінії А-549, прикріплених та неприкріплених до субстрату.

Проведене комплексне вивчення функціонування регуляторних систем, що локалізовані в головних компартментах - в плазматичній мембрані, цитоплазмі та ядрі - клітин, що характеризуються різною скерованістю проліферативної відповіді на дію ТФР- $\beta$ . Отримано дані, що вказують на важливу роль рецепторної системи ТФР- $\beta$ , співвідношення внутрішньоклітинних концентрацій циклічних нуклеотидів (сАМР і сГМР), біосинтезу окремих клітинних білків та активності секретованих клітинами плазміноподібних протеїназ у забезпеченні різного характеру дії ТФР- $\beta$  на проліферацію. Запропоновано гіпотезу, згідно до якої не присутність ТФР- $\beta$  у середовищі, а морфофункціональний стан клітин, особливості їх мікрооточення та умови застосування ТФР- $\beta$  визначають скерованість проліферативної відповіді клітин на дію даного фактора росту.

Виявлено подібність у деяких результатах дії на клітини-мішені ТФР- $\beta$  та ЕФР, з одного боку, і гіпертермічної обробки клітин, з іншого боку. Ця подібність стосується активності секретованих клітинами плазміноподібних протеїназ та рівня м-РНК протоонкогенів c-myc і c-fos.

У зародках в'яна на стадії пізньої бластули виявлені поліпептидні речовини, що володіють фізико-хімічними та біологічними властивостями ТФР- $\beta$ . У клітинах зародків цього виду костистих риб знаходяться і специфічні рецептори ТФР- $\beta$ .

Практичне значення роботи. Модифіковано окремі етапи виділення та очистки ТФР- $\beta$  з тромбоцитів крові свині, що дозволило вдосконалити традиційний метод очистки цього фактора росту, підвищивши вихід кінцевого продукту. Отриманий нами препарат ТФР- $\beta$  використовувався в науково-дослідних роботах, які проводилися в Інституті цитології РАН /Санкт-Петербург/, Інституті цитології і генетики СВ РАН /Новосібірськ/, Інституті канцерогенезу ОНЦ АМН РФ /Москва/, Інституті біохімії АН України /Київ/, Інституті проблем загальної патології, онкології та радіобіології АН України /Київ/, Центральному інституті молекулярної біології /Берлін, Німеччина/, Університеті м. Росток /Німеччина/ та в інших наукових закладах. Крім того, він використовувався для виконання планових наукових досліджень у Відділенні регуляторних систем клітини Інституту біохімії АН України /Львів/.

Узагальнення отриманих в роботі результатів, що враховують походження клітин-мішеней, а також характеристики їх окремих регуляторних систем і особливості мікрооточення, дозволяють передбачати з великою ступінню імовірності скерованість впливу ТФР- $\beta$  на проліферативну активність нормальних і пухлинних клітин тварин і людини. Ці дані необхідно враховувати при розробці фармакологічних препаратів, у яких ТФР- $\beta$  в поєднанні з іншими факторами росту рекомендується для стимуляції загоєння ран та для пригнічення росту пухлинних клітин.

Запропоновано використовувати визначення відношення внутрішньоклітинних концентрацій [cAMP]/[cGMP] при прогнозуванні проліферативної активності нормальних і пухлинних клітин тварин і людини.

Виявлення поліпептидних речовин з властивостями ТФР- $\beta$ , а також специфічних рецепторів цього фактора росту в клітинах зародків костистої риби в'яна дозволяє запропонувати цей об'єкт в якості альтернативної експериментальної моделі при вивченні молекулярних механізмів ембріональної індукції мезодерми. Даний об'єкт вимагає значно менших витрат матеріальних засобів та часу в порівнянні з іншими об'єктами, що використовуються з цієї метою за кордоном.

Результати роботи використовуються при читанні спецкурсу "Молекулярні механізми регуляції проліферації та диференціації клітин" на кафедрі біохімії біологічного факультету Львівського державного університету ім.І.Франка. Окремі положення, що витікають з результатів проведених досліджень, включені в опубліковану в співавторстві з професором С.Я.Кусенем монографію "Молекулярні механізми в действии полипептидных факторов роста" /М., Наука, 1985; 236 с./.

Апробація роботи та публікації. Основні результати дисертаційної роботи доповідалися та обговорювалися на VII Всесоюзній нараді ембріологів /Ленінград, 1985/, IV Всесоюзному з'їзді онкологів /Ленінград, 1986/, V і VI Українському біохімічному з'їзді /Івано-Франківськ, 1987, Київ, 1992/, IV з'їзді ендокринологів УРСР /Львів, 1987/, Всесоюзному симпозиумі "Молекулярні та функціональні механізми онтогенезу" /Харків, 1987/, II і III Всесоюзній робочій нараді по вивченню ролі морфогенетично активних факторів у різних процесах /Пушино, 1988, 1992/, IV Міжнародному конгресі з клітинної біології /Монреаль, 1988/, Всесоюзній нараді "Актуальні питання клітинної біології" /Ленінград, 1989/, Міжнародному симпозиумі "Фактори росту: їх природа та роль в медицині" /Берлін, 1989/, 19 і 20 конференціях Федерації європейських біохімічних товариств /Рим, 1989, Будапешт, 1990/, Міжнародному симпозиумі з молекулярної та клітинної онкобіології /Львів, 1990/, Радянсько-фінському симпозиумі з біології розвитку /Суздаль, 1991/, Міжнародному симпозиумі "Структура та функції регуляторних поліпептидів" /Москва, 1992/, VI з'їзді товариства генетиків і селекціонерів ім.М.І.Вавілова /Мінськ, 1992/, науковому семінарі Центрального інституту молекулярної біології /Берлін, 1990/, на засіданні Ученої ради Інституту біохімії АН України /Київ, 1989, 1992/.

За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 21 стаття, 24 тези доповідей та 1 монографів /у співавторстві/.

Структура та об'єм роботи. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури /6 розділів/, опису матеріалів і методів /12 розділів/, результатів дослідження /12 розділів/, обговорення результатів /3 розділи/, заключення, висновків та списку цитованої літератури /365 джерел/. Робота викладена на 274 сторінках друкованого тексту, ілюстрована 60 малюнками та 4 таблицями.

#### Матеріали та методи дослідження

В роботі використані клітини таких ліній: NIH-3T3 і Swiss-3T3 з ембріонів миші, NRK-49F із нормальної нирки щура, CHO-719 із яєчника китайського хом'ячка, HT-1080 із фібросаркоми людини та A-431 з ембріоїдної карциноми людини /отримані з колекції клітинних культур при Інституті цитології РАН /Санкт-Петербург//; A-549 з аденокарциноми легень людини, ССІ-64 із карциноми легень норки /отримані з колекції клітинних культур при Інституті канцерогенезу ОНЦ АМН РФ /Москва// та ПС-103 /клони 384/5 і 306/ із саркоми, індукованої імплантацією поліхлорвінілової пластинки миші лінії СВА /яко"язно надані д.м.н. Ставровськов А.А./.

Клітини всіх ліній, за винятком лінії ПС-ІОЗ, культивували в середовищі Ігла у модифікації Дульбекко /середовище DME, Flow Lab., Великобританія/ із додачем 10% /за об'ємом/ сироватки крові плодів великої рогатої худоби /"Диалек", Мінськ/. Клітини лінії ПС-ІОЗ культивували у мінімальному середовищі Ігла (Flow Lab.) із додачем 10% сироватки крові великої рогатої худоби /Московський м'ясокомбінат/.

Субстратнезалежну проліферацію клітин вивчали, використовувачи 40 мм пластикові чашки Петрі, в які заливали 1 мл середовища DME, що містило 10% сироватки крові плодів великої рогатої худоби і 0,5% агару /Difco, США/. На таку підкладку в кожному чашку вносили 1 мл суспензії клітин /10<sup>4</sup>/, приготованія в середовищі для культивування з додачем 0,33% агару. В залежності від варіанта досліду до суспензії додавали досліджувані фактори росту. Чашки з клітинами інкубували протягом 14 діб в CO<sub>2</sub>-термостаті в атмосфері 5% CO<sub>2</sub> і 95% повітря при 37° С і 100% вологості. Після завершення досліду підраховували кількість клітинних колоній, що мали в діаметрі понад 50 мкм.

Інтенсивність субстратзалежного росту клітин визначали в 24-лункових пластикових планшетах (Flow Lab.), до кожної лунки яких вносили 10<sup>4</sup> клітин в 1 мл середовища DME, що містило 10% сироватки крові плодів великої рогатої худоби. Після прикріплення та розпластування клітин /16 годин/ культуральне середовище міняли на свіже, яке, в залежності від варіанта досліду, містило досліджувані фактори росту і/чи/ різні концентрації сироватки крові. Клітини інкубували протягом 24 годин /або як вказано в умовах досліду/ в CO<sub>2</sub>-термостаті. В останні 4 години інкубації в лунки додавали <sup>3</sup>H-тимідин. Рівень радіоактивності ДНК визначали, використовувачи загально прийнятий метод /Остерман, 1984/, на сцинтиляційному лічильнику Mark III /Траког, Нідерланди/.

Виділення та очистку ТФР- $\beta$  з тромбоцитів крові свині здійснювали, використовувачи раніше описаний метод (Roberts et al., 1984/ та наші модифікації окремих етапів очистки. В результаті отримано препарат ТФР- $\beta$ , гомогенність якого за даними електрофорузу в поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію з фарбуванням білків азотнокислим орбілом перевищує 95%.

<sup>125</sup>I-ТФР- $\beta$  отримували, використовувачи хлорамін Т (Ruff, Rizzi, 1986). Радіорецепторний аналіз, ковалентне зв'язування <sup>125</sup>I-ТФР- $\beta$  з рецепторами, вивчення кооперативності рецепторів ТФР- $\beta$  та їх знижувчої регуляції (down regulation) здійснювали

з допомогов загально прийнятих методів (Corin, Donner, 1982, Massague, 1985, Scatchard, 1949, Wakefield, 1987).

Процеси транспорту  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  в клітинах вивчали, використовувачи клітини, висіяні в 24-дуночні пластикові планшети.

Вміст cAMP і cGMP в клітинах визначали з допомогов наборів фірми Amersham /Великобританія/.

Для отримання безсироваткових культуральних середовищ, кондиційованих клітинами, останні висівали у великі культуральні флакони /Munclone, Данія/ і після досягнення стану субконфленту культуральне середовище видаляли, клітини промивали декілька раз безсироватковим середовищем і залишали їх у ньому на 24 години. Після заміни цього середовища клітини інкубували в безсироватковому середовищі на протязі 48 годин для кондиціонування.

Теплову обробку клітин здійснювали при  $44^{\circ}\text{C}$  на протязі 30 хвилини. Збирали кондиційовані середовища, отримані через різні проміжки часу /48, 24, 12, 6, 4, 3, 2 і 1 година/ після припинення гіпертермії.

Електрофорез у поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію здійснювали за методом Lemmlі (Lemmlі, 1970) в пластинках геля з градієнтом концентрації акриламіду від 7 до 17%.

Процеси біосинтезу білків у клітинах вивчали за включенням  $^3\text{H}$ -лейцину в клітинні білки або  $^{35}\text{S}$ - метіоніну в окремі білкові фракції, отримані за допомогов електрофорезу. В першому випадку радіоактивність проб визначали, використовувачи сцинтиляційний лічильник, а в другому - за оптичних густинио радіоавтографів електрофореграм.

Активність серинових протеїназ у концентрованих ультрафільтраціях /Amicon, США/ кондиційованих культуральних середовищах визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 405 нм, використовувачи синтетичний субстрат Zd-апа-апа-фен-арг-паранітроанілід /Діагностикум, Москва/.

Визначення рівня м-РНК протоонкогенів c-myc і c-fos здійснювали після отримання сумарної клітинної РНК, використовувачи метод, описаний Бірнбоймом (Birnbom, 1988). РНК відділяли від ДНК вибірково осадженням у суміші LiCl/етанол. РНК, денатуровану формамідом, наносили на нейлонову підкладку і "прививали" з допомогов опромінення ультрафіолетовим світлом. ДНК-проби, що містили гени c-myc чи c-fos і були мічені  $^{32}\text{P}$ , отримували за допомогов методу випадкового праймера, використовувачи набір фірми Amersham. Гібридизація  $^{32}\text{P}$ -ДНК з РНК, іміобілізованое на нейлоновому фільтрі, здійснювали, використовувачи загально-прийнятий метод /Maniatis та ін., 1984/. Радіоавтографи сканували на лазерному денситометрі

GS-9000 /Shimadzu, Японія/.

Зародки в"на отримували за допомогою методу, запропонованого Нейфахом /1959/. Зародки інкубували при 20° С до досягнення ними потрібної стадії розвитку. Протеазочутливі фактори з властивостями ТФР- $\alpha$  отримували за допомогою методу, описаного Робертс та співавторами (Roberts et al., 1984). Біологічну активність ТФР- $\alpha$ -подібних факторів із зародків в"на визначали, використовувачи клітини, чутливі до рістрегуляторної дії ТФР- $\alpha$  /фіброласти лінії NIH-3T3, карциномні клітини лінії А-549 і саркомні клітини лінії PC-103 /клон 384/5/. Специфічне зв"язування  $^{125}$ I-ТФР- $\alpha$  свині клітинами зародків в"на вивчали за допомогою загально-прийнятих методів (Scatchard, 1949, Massague, 1985, Wakefield, 1987).

Кожний експеримент повторювали 2-4 рази з 3-4 паралельними дослідженнями. Кожна точка наведених діаграм та ордината гістограм відповідає середньому значенню 3-4 вимірювань в одному з декількох однотипних експериментів. Порівняння двох змінних величин здійснювали на основі  $t$ -критерію Стьюдента. В дисертаційній роботі говориться про зміни лише в тих випадках, коли  $P < 0,05$ .

### Основні результати досліджень

#### I. Вплив ТФР- $\alpha$ на субстратнезалежну проліферацію клітин

Біологічну активність ТФР найчастіше визначають, враховувачи їх здатність індукувати субстратнезалежну проліферацію нормальних клітин (Roberts, Sporn, 1985). З цієї метов клітини-мішені інкубують у напіврідкому культуральному середовищі, що містить 0,33% агару. За таких умов проліферативну активність оцінюють за кількістю колоній, які утворюються в результаті багатьох мітотичних поділів окремих клітин.

З рис.1 видно, що всі досліджувані нами клітини, враховувачи характер їх проліферативної відповіді на дію ТФР- $\alpha$ , можна розділити на три типи: 1. псевдонормальні фіброласти та фібробластні клітини /лінії NIH-3T3, Swiss-3T3, NRK-49F, CHO-719/, що не змінюють проліферативної активності під впливом самого ТФР- $\alpha$ ; 2. клітини з саркомних пухлин /лінії HT-1080 і PC-103 /клони 384/5 і 3сб//, що стимулюються ТФР- $\alpha$ ; 3. клітини з карциномної пухлини /лінія А-549/, проліферація яких інгібується ТФР- $\alpha$ .

Зрозуміло, що *in vivo* жоден з факторів росту, включаючи ТФР- $\alpha$ , не діє на клітини окремо від інших біорегуляторів. Враховувачи вищезазначену розповсюдженість в організмі ссавців ЕФР /Никольський і ін., 1987/ та інсуліну (King, Kahn, 1985), ми вивчили вплив дії ТФР- $\alpha$  разом з ЕФР і/чи/ інсуліном на інтенсивність субстратнезалежної проліферації вищезазначених клітин.

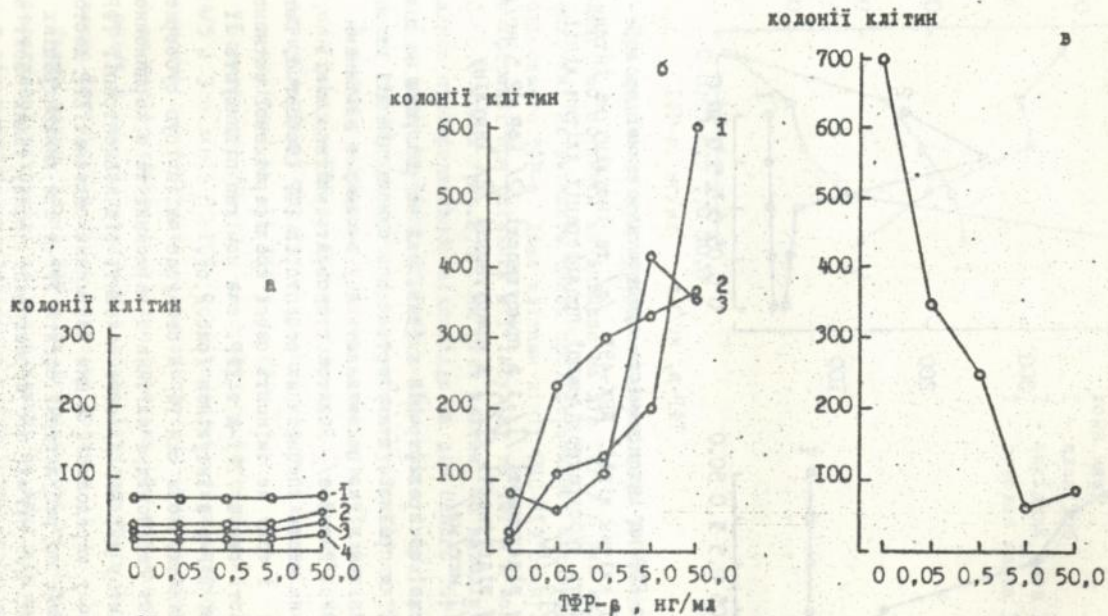


Рис.1. Вплив ТФР- $\beta$  на інтенсивність субстратнезалежної проліферації клітин різного походження:  
 а - псевдонормальні клітини (1 - NRK-49F, 2 - MIN-3T3, 3 - Swiss-3T3, 4 - CHO-719)  
 б - клітини з саркомних пухлин (1 - РС-103 /клон 384/5/, 2 - РС-103 /клон 3сб/, 3 - НТ-1080/  
 в - клітини з карциномної пухлини /А-549/

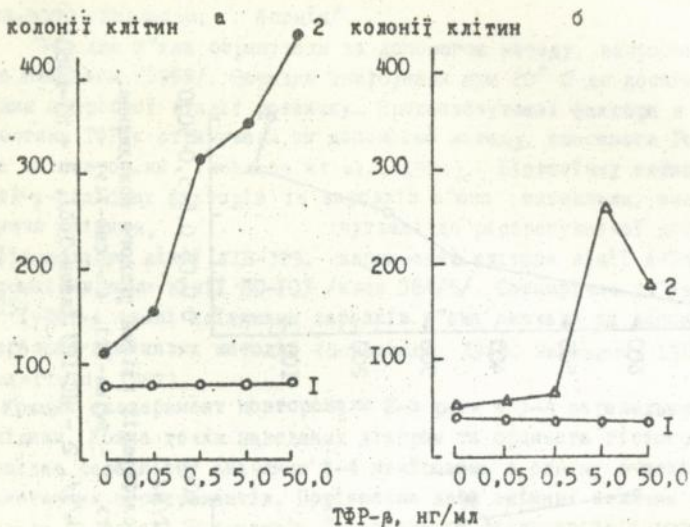


Рис.2. Вплив ЕФР на інтенсивність субстратнезалежної проліферації клітин лінії NRK-49F /а/ та інсуліну на інтенсивність субстратнезалежної проліферації клітин лінії CHO-719 /б/  
 а - у відсутності /I/ і в присутності /2/ ЕФР /2,5 нг/мл/  
 б - у відсутності /I/ і в присутності /2/ інсуліну /1 мкг/мл/

Встановлено, що проліферація клітин, які не реагують на дію самого ТФР- $\beta$ , як правило, стимулюється при одночасній дії на них ще й ЕФР. Найбільш чітко це виявляється у випадку з клітинами лінії NRK-49F /Рис.2,а/. Виняток становлять клітини лінії CHO-719, які не мають специфічних рецепторів ЕФР (Todderud, Carpenter, 1989) і тому не змінюють своєї проліферативної активності у присутності суміші ТФР- $\beta$  з ЕФР, але помітно підвищують її при дії суміші ТФР- $\beta$  з інсуліном /рис.2,б/.

У тих випадках, коли сам ТФР- $\beta$  стимулює чи інгібує субстратнезалежний ріст /відповідно клітини з саркомних та з карциномної пухлин/, характер дії ЕФР суттєво залежить від концентрації ТФР- $\beta$  у культуральному середовищі. У цих клітинних системах ЕФР достовірно не впливає на регуляторні ефекти ТФР- $\beta$  при концентраціях останнього 0,05-0,5 нг/мл, але перешкоджає прояву таких ефектів, що індукуються ТФР- $\beta$  в концентраціях 5,0-50,0 нг/мл.

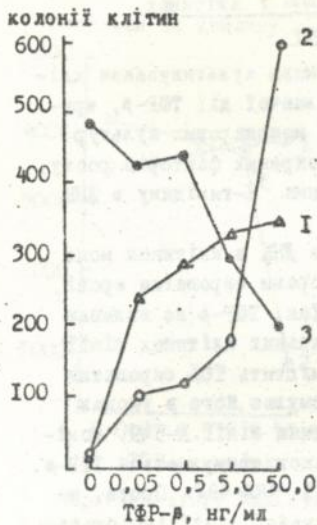


Рис. 3. Вплив ТФР-β на інтенсивність субстратнезалежної проліферації клітин лінії РС-103 з саркоми миші

1 - клон 3сб

2 - вихідний клон 384/5

3 - субклон клона 384/5

При додачі до культурального середовища ТФР-β та інсуліну виявлено, що останній не впливає на дію ТФР-β у тих клітинних системах, які не змінюють своєї проліферативної активності в присутності самого ТФР-β. Лише клітини лінії СНО-719 стимулюються до проліферації при спільній дії інсуліну та ТФР-β в концентрації 5,0-50,0 нг/мл /рис.2,б/. На ріст клітин, що володіють чітко вираженою проліферативною відповіддю на дію самого ТФР-β /пухлинні клітини лінії НТ-1080, РС-103, А-549/ суміш інсуліну та ТФР-β впливає подібно до того, як це робить суміш ЕФР та ТФР-β.

У випадку одночасної дії на досліджувані клітини трьома факторами росту - ТФР-β, ЕФР та інсуліном - ефект в кожному окремо взятому варіанті дослідження є різним, хоч у більшості випадків він все ж подібний на дію ТФР-β та ЕФР.

Встановлено /Рис.3/, що проліферація саркомних клітин клонів 384/5 і 3сб лінії РС-103, що характеризуються низькою вихідною інтенсивністю субстратнезалежного росту, стимулюється ТФР-β. У той же час проліферація клітин субклона, що отриманий нами з клона 384/5 і характеризується високою інтенсивністю цього процесу, суттєво інгібується даним фактором росту.

Таким чином, вплив ТФР-β на скерованість та вираженість проліферативної відповіді клітин залежить не лише від тканинного, але й від клонального походження клітин-мішеней, а також від одночасної дії на них інших факторів росту, зокрема, ЕФР та інсуліну.

## 2. Вплив ТФР- $\beta$ на інтенсивність біосинтезу ДНК у клітинах за різних умов їх субстратозалежного росту

Для того, щоб з'ясувати, як впливають умови культивування клітин на скерованість та вираженість рістрегулювчої дії ТФР- $\beta$ , зручніше проводити дослідження з використанням моношарових культур клітин. У таких дослідах рістрегулювчу дію окремих факторів росту, як правило, оцінюють за їх впливом на включення  $^3\text{H}$ -тимідину в ДНК клітин-мішеней.

Встановлено, що вплив ТФР- $\beta$  на біосинтез ДНК в клітинах може суттєво залежати від їх забезпеченості факторами сироватки крові, що додається до культурального середовища. Так, ТФР- $\beta$  не впливає на інтенсивність цього процесу в псевдонормальних клітинах лінії NRK-49F при їх інкубації в середовищі, що містить 10% сироватки крові плодів великої рогатої худоби, але стимулює його в умовах її гострого дефіциту /0,1%. Карциномні клітини лінії А-549, поміщені в середовище з 0,1% сироватки крові, також стимулюються ТФР- $\beta$ , хоч і в значно меншій мірі, ніж клітини лінії NRK-49F. Проте, на відміну від останніх, карциномні клітини названої лінії інгібуються ТФР- $\beta$  при їх інкубації в середовищі, добре забезпеченому сироваткою крові /10%/.

Звертає на себе також увагу значно менш виражений інгібувальний вплив ТФР- $\beta$  на ріст карциномних клітин лінії А-549 при їх культивуванні в моношарі в порівнянні з тим, що опостерігається в умовах напіврідкої культури.

Фібробласти лінії NIH-3T3 і Swiss-3T3 не реагують на дію ТФР- $\beta$  незалежно від концентрації сироватки крові в культуральному середовищі. Проте, коли на ці клітини діяти ТФР- $\beta$  у поєднанні з ЕФР і/чи/інсуліном, то в окремих варіантах досліду все ж виявляється регуляторний вплив ТФР- $\beta$ . Отже відсутність впливу ТФР- $\beta$  на біосинтез ДНК в клітинах та на їх проліферацію ще не означає, що дія цього фактора росту не виявляється при наявності в середовищі інших біорегуляторів, які, до речі, самі по собі можуть бути неактивними.

Нами також вивчено вплив ТФР- $\beta$  та його поєднань з ЕФР і/чи/інсуліном на включення  $^3\text{H}$ -тимідину в ДНК клітин лінії NIH-3T3 та NRK-49F за умов різної тривалості їх взаємодії з цими клітинами. Фібробласти лінії NIH-3T3 інкубували протягом 24 та 72 годин в середовищі, що містило 6% сироватки крові плодів великої рогатої худоби. Показано, що ТФР- $\beta$  достовірно не впливає на біосинтез ДНК в цих клітинах, що інкубуються протягом 24 годин в присутності ЕФР /Рис. 4/. Проте після збільшення часу інкубації до 72 годин цей процес суттєво інгібується ТФР- $\beta$ , причому такий ефект чітко виявляється лише при використанні відносно високої концентрації ТФР- $\beta$  - 50 нг/мл.

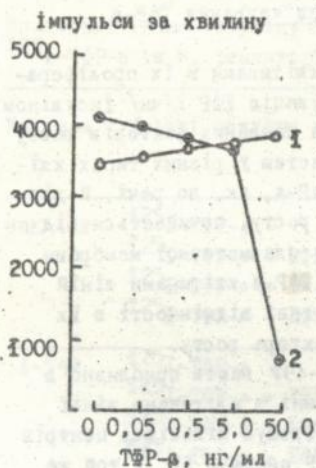


Рис. 4. Вплив ТФР- $\beta$  на інтенсивність включення  $^3\text{H}$ -тимідину в ДНК фібробластів лінії НІН-3Т3 при їх інкубації протягом 24 годин /1/ та 72 годин /2/ в культуральному середовищі, що містило 6% сироватки крові плодів великої рогатої худоби та ЕФР /2,5 нг/мл/

Клітини лінії NRK-49F інкубували в середовищі, що містило 0,1% сироватки крові, протягом 24, 48 та 86 годин. Показано, що при 24-годинній інкубації цих клітин у присутності ЕФР має місце стимулюючий вплив ТФР- $\beta$  на біосинтез ДНК, а при більш тривалих інкубаціях /48 та 86 годин/ ТФР- $\beta$  не виявляє такого впливу.

При одночасній дії ТФР- $\beta$  та інсуліну на клітини ліній НІН-3Т3 та NRK-49F в деяких випадках інтенсивність біосинтезу ДНК також залежить від тривалості взаємодії клітин з названими факторами росту.

Встановлено, що сам ТФР- $\beta$  не впливає на інтенсивність біосинтезу ДНК у фібробластах лінії Swiss-3T3, що інкубуються за умов їх різної щільності на субстраті-підкладці. У той же час виявлено суттєві відмінності в дії цього фактора росту в присутності ЕФР і/чи інсуліну за умов рідкої / $10^4$  клітин/ $2 \text{ см}^2$ / та щільної / $10^5$  клітин/ $2 \text{ см}^2$ / культур. Так, у першому випадку ТФР- $\beta$  дозозалежно інгібує біосинтез ДНК, індукований ЕФР. У другому випадку ЕФР не впливає на біосинтез ДНК, зате інсулін стимулює його, а ТФР- $\beta$  в концентрації 5,0-50,0 нг/мл інгібує стимулюючу дію суміші інсуліну та ЕФР.

Отже ТФР- $\beta$  характеризується надзвичайно різноманітністю проявів рістрегулюючої дії. Тому є вкрай необхідним проведення досліджень, присвячених вивченню клітинних регуляторних систем, які опосередковують різний за скерованістю вплив ТФР- $\beta$  на проліферативну активність клітин тварин і людини.

### 3. Вплив ЕФР та інсуліну на специфічне зв'язування ТФР- $\beta$

Враховуючи дані про відмінності між клітинами в їх проліферативній відповіді на дію ТФР- $\beta$  та про модуляцію ЕФР і/чи/ інсуліном його рiстрегулювчої дії, ми вивчили вплив названих факторів росту на функціонування окремих регуляторних систем у різних типах клітин-мішеней. Відомо, що біологічна дія ТФР- $\beta$ , як, до речі, й дія будь-якого іншого поліпептидного фактора росту, починається від його зв'язування специфічними рецепторами плазматичної мембрани клітин-мішеней. Ми дослідили зв'язування ТФР- $\beta$  клітинами ліній NRK-49F та A-549, між якими виявлено суттєві відмінності в їх проліферативній відповіді на дію цього фактора росту.

З табл. I видно, що клітини лінії NRK-49F мають приблизно в 5 разів більше рецепторів ТФР- $\beta$  у порівнянні з клітинами лінії A-549. В клітинах першої лінії інсулін збільшує кількість центрів зв'язування ТФР- $\beta$ , а суміш інсуліну з ЕФР зменшує її. У той же час у клітинах другої лінії закономірності зміни цього показника є зовсім іншими. Тут ЕФР збільшує кількість рецепторів ТФР- $\beta$ , а різні поєднання досліджуваних факторів росту достовірно не впливають на нього. В усіх цих випадках  $K_d$  рецепторів ТФР- $\beta$  суттєво не змінюється. Таким чином, наведені дані свідчать про існування відмінностей між клітинами ліній NRK-49F та A-549 в характері трансмодуляції рецепторів ТФР- $\beta$  під впливом ЕФР і/чи/ інсуліну.

В клітинах лінії NRK-49F нами також виявлено знижувчу регуляцію (down regulation) кількості рецепторів ТФР- $\beta$ . Встановлено, що преінкубація цих клітин протягом 2 годин при 37° С в присутності неміченого ТФР- $\beta$  викликає зниження на 47% рівня специфічного зв'язування  $^{125}\text{I}$ -ТФР- $\beta$ . Цікаво відзначити, що приблизно таке ж за величиною зниження рівня зв'язування цього фактора росту спостерігається при дії холерного токсину /10 нг/мл./.

Використовуючи метод, що заснований на визначенні кінетики дисоціації зв'язаного міченого ліганда в присутності та у відсутності неміченого ліганда в середовищі (Cogan, Donner, 1982), ми виявили, що звільнення  $^{125}\text{I}$ -ТФР- $\beta$  від зв'язку з рецепторами клітин лінії NRK-49F відбувається більш інтенсивно у першому випадку, ніж у другому. Максимальна різниця досягає 15% і спостерігається в перші 5-50 хвилин інкубації клітин. Ці дані вказують на зниження спорідненості рецепторів до ТФР- $\beta$  за умов їх насичення ліганом, що дозволяє припускати існування явища негативної кооперативності рецепторів даного фактора росту.

Таблиця 1.

Вплив ЕФР і/чи/ інсуліну на кількість центрів зв'язування  $^{125}\text{I}$ -ТФР- $\beta$  та  $K_d$  рецепторів ТФР- $\beta$  в клітинах ліній NRK-49F і A-549

Клітини	: Додані фактори росту	: Кількість цент- : рів зв'язування:	: $K_d$ , пМ
:	:	: $^{125}\text{I}$ -ТФР- $\beta$ в	:
:	:	: клітині	:
NRK-49F	$^{125}\text{I}$ -ТФР- $\beta$	49300 $\pm$ 3000	27,3 $\pm$ 3,0
	$^{125}\text{I}$ -ТФР- $\beta$ + ЕФР	40900 $\pm$ 6000	24,3 $\pm$ 5,0
	$^{125}\text{I}$ -ТФР- $\beta$ + інсулін	81200 $\pm$ 9000*	28,7 $\pm$ 11,0
	$^{125}\text{I}$ -ТФР- $\beta$ + ЕФР + інсулін	31300 $\pm$ 4000*	23,6 $\pm$ 6,0
A-549	$^{125}\text{I}$ -ТФР- $\beta$	9700 $\pm$ 700	27,0 $\pm$ 6,0
	$^{125}\text{I}$ -ТФР- $\beta$ + ЕФР	21600 $\pm$ 900 *	32,7 $\pm$ 8,0
	$^{125}\text{I}$ -ТФР- $\beta$ + інсулін	13200 $\pm$ 800	31,4 $\pm$ 6,0
	$^{125}\text{I}$ -ТФР- $\beta$ + ЕФР + інсулін	14400 $\pm$ 1100	27,2 $\pm$ 5,0

#### 4. Вплив ТФР- $\beta$ та ЕФР на транспорт $\text{Ca}^{2+}$ в клітинах

Відомо, що  $\text{Ca}^{2+}$  грає важливу роль у забезпеченні нормального функціонування багатьох життєво важливих процесів у клітинах тварин і людини (Rasmussen, 1989). Тому було доцільним вивчити вплив ТФР- $\beta$  та ЕФР на швидкість проникнення  $\text{Ca}^{2+}$  в клітини та швидкість екструзії цього катіона в позаклітинне середовище з використанням клітин, що характеризуються різною проліферативною відповіддю на дію ТФР- $\beta$ .

Як об'єкт для досліджень ми використали псевдонормальні клітини ліній NIH-3T3 та NRK-49F, а також карциномні клітини ліній A-549 та CCI-64. Для клітин усіх цих ліній виявлено однакову закономірність, яка полягає у підвищенні швидкості проникнення  $\text{Ca}^{2+}$  в клітини при дії на них ТФР- $\beta$  чи ЕФР. При спільній дії ці два фактори росту, як правило, викликають більше зростання швидкості транспорту  $\text{Ca}^{2+}$ , ніж при дії кожного з них окремо.

Вплив ТФР- $\beta$  та ЕФР на екструзію  $\text{Ca}^{2+}$  в позаклітинне середовище вивчали після попереднього "навантаження" клітин  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ . Показано, що для клітин ліній NIH-3T3, NRK-49F і A-549 характерне зниження швидкості екструзії  $\text{Ca}^{2+}$  під впливом суміші ТФР- $\beta$  та ЕФР, тоді як клітини лінії CCI-64 не проявляють такої закономірності.

#### 5. Вплив ТФР- $\beta$ , ЕФР, інсуліну та сироватки крові на вміст cAMP та cGMP в клітинах

Результати визначення впливу ТФР- $\beta$  і різних його послідовів з ЕФР та інсуліном, а також сироватки крові на вміст cAMP та cGMP

в карциномних клітинах лінії А-549 і в псевдонормальних клітинах лінії МІН-3Т3 і NRK-49F наведені у вигляді відношення внутрішньоклітинних концентрацій  $[cAMP]/[cGMP]$  /табл.2/. Такий аналіз дозволив виявити деякі цікаві закономірності. З табл.2 видно, що величина  $[cAMP]/[cGMP]$  є значно більшою у псевдонормальних клітинах ліній МІН-3Т3 та NRK-49F, ніж у карциномних клітинах лінії А-549. Ця відмінність головним чином зумовлена суттєво вищим вмістом cGMP в пухлинних клітинах у порівнянні з псевдонормальними клітинами. В цілому, такий стан зберігається і після дії на клітини різними факторами росту, хоч типи клітин відрізняються між собою за вираженість впливу факторів росту на вказане відношення. Так, при дослідженні карциномних клітин лінії А-549 нами не виявлено впливу ТФР- $\beta$  на величину відношення  $[cAMP]/[cGMP]$ , тоді як ЕФР та інсулін, а також різні поєднання названих факторів росту з ТФР- $\beta$  викликають зменшення даного показника. В той же час 20% сироватка крові індукуює в цих клітинах збільшення відношення  $[cAMP]/[cGMP]$ .

Інша картина спостерігається для фібробластів лінії МІН-3Т3. Тут всі фактори росту, що використовувалися поодиночі чи в різних поєднаннях, за винятком тих, до складу яких входив інсулін, викликали збільшення відношення  $[cAMP]/[cGMP]$  і лише дія сироватки крові вела до його зменшення.

Діючи на клітини лінії NRK-49F, сам ТФР- $\beta$  та сам ЕФР викликали збільшення величини  $[cAMP]/[cGMP]$ , тоді як різні поєднання досліджуваних факторів росту, в першу чергу ті з них, до складу яких входив інсулін, викликали зменшення цієї величини. Як і у випадку з клітинами лінії МІН-3Т3, 20% сироватка крові в клітинах лінії NRK-49F зменшувала величину  $[cAMP]/[cGMP]$ .

Таким чином, нами виявлені суттєві відмінності між карциномними клітинами лінії А-549 та псевдонормальними клітинами ліній МІН-3Т3 і NRK-49F не лише в загальному вмісті в них cAMP та cGMP, але і в характері змін внутрішньоклітинних концентрацій цих циклічних нуклеотидів під впливом ТФР- $\beta$ , ЕФР, інсуліну та факторів сироватки крові плодів великої рогатої худоби.

#### 6. Вивчення аутокринної регуляції проліферації клітин

Результати, наведені в рис.5, свідчать про те, що карциномні клітини лінії А-549 кондиціюють безсироваткове середовище регуляторами росту клітин. Після 2-4-добового кондиціонування в культуральному середовищі виявляються переважно стимулятори росту. В той же час після 6-добового кондиціонування, коли виникають умови, що несприятливі для клітинної проліферації /велика щільність клітин на субстраті-підкладці, зниження величини рН середовища/, в конди-

Таблиця 2.

Вплив ТФР- $\beta$ , ЕФР, інсуліну та сироватки крові плодів великої рогатої худоби на величину відношення концентрацій  $[cAMP]/[cGMP]$  в клітинах різного походження

Лінія клітин	$[cAMP]/[cGMP]$																	
A-549	:	3,4	:	3,1	:	2,1	:	2,4	:	0,7	:	1,3	:	1,6	:	1,6	:	6,4
NIH-3T3	:	34,7	:	81,6	:	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
ТФР- $\beta$	:	-	:	+	:	-	:	+	:	-	:	+	:	-	:	+	:	-
ЕФР	:	-	:	-	:	+	:	+	:	-	:	-	:	+	:	+	:	-
інсулін	:	-	:	-	:	-	:	-	:	+	:	+	:	+	:	+	:	-
сироватка крові	:	-	:	-	:	-	:	-	:	-	:	-	:	-	:	-	:	+

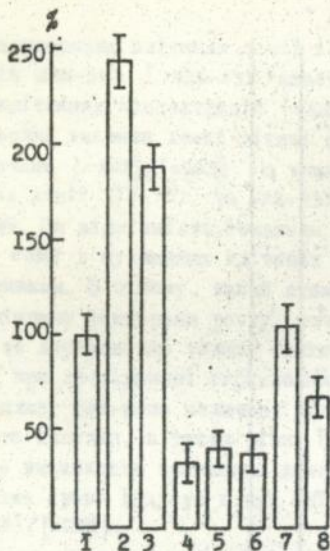


Рис. 5. Вплив ТФР- $\beta$  та безсироваткових кондиційованих середовищ, отриманих за різних умов культивування карциномних клітин лінії А-549, на інтенсивність включення  $^3\text{H}$ -тимідину в ДНК клітин цієї ж лінії /по осі ординат - % від контролю/

1 - контроль /свіже безсироваткове середовище/  
 2 - 2-добове кондиційоване середовище /рН 7,2/  
 3 - 4-добове кондиційоване середовище /рН 6,9/  
 4 - 6-добове кондиційоване середовище /рН 6,3/  
 5 - кондиційоване середовище /рН 7,2/, закислене до рН 4,0 з допомогою пропускання  $\text{CO}_2$

6 - кондиційоване середовище /рН 7,2/, закислене до рН 2,0 з допомогою титрування  $\text{HCl}$   
 7 - кондиційоване середовище /рН 7,2/ з додачем ТФР- $\beta$  /20 нг/мл/  
 8 - свіже безсироваткове середовище з додачем ТФР- $\beta$  /5 нг/мл/  
 /перед використанням рН усіх культуральних середовищ доводили до 7,2/

ційованому середовищі виявляються й інгібітори росту. Деякі з цих інгібіторів, очевидно, наявні в латентній формі також і в 2-добовому кондиційованому середовищі. Адже показано, що тимчасове закислення цього середовища перетворює його з рістстимулюючого у рістінгібуєче.

У безсироватковому культуральному середовищі, кондиційованому клітинами лінії PC-103 /клон 384/5/ з саркоми миші, також виявлені речовини з властивостями факторів росту. Вони частково очищені з допомогою гел'фільтрації на колонці, наповненій біогелем Р-30, з елюцією 1 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . Отримані речовини стимулюють субстратнезалежну проліферацію клітин лінії NRK-49F і конкурують з  $^{125}\text{I}$ -ЕФР за специфічні рецептори останнього на клітинах лінії А-431.

У середовищі, кондиційованому псевдонормальними фібробластами лінії МН-3Т3, містяться речовини, які стимулюють синтез ДНК у цих клітинах та в карциномних клітинах лінії А-549. Виявлено, що тимчасове закислення цього кондиційованого сере-

довища не змінює його рістрегулюючих властивостей по відношенню до клітин ліній МІН-3Т3 та А-549.

### 7. Вплив гіпертермічної обробки клітин на їх аутокринні функції

Виявлено, що гіпертермічна обробка /44° С, 30 хвилин/ псевдонормальних клітин лінії МІН-3Т3 та пухлинних клітин ліній А-549 і РС-103 /клон Зсб/ по різному впливає на їх аутокринні функції /секреція речовин, які регулюють біосинтез ДНК та білків у клітинах/. Найбільш суттєві зміни у вираженості цих функцій характерні для клітин лінії А-549. Показано, що кондиційоване середовище, отримане через 48 годин після припинення дії теплового шоку на клітини лінії А-549, в 3,3 раз активніше стимулює біосинтез ДНК, ніж звичайне кондиційоване середовище. Після тимчасового закислення рістстимулююча активність цього кондиційованого середовища втрачається. Більше того, дане середовище набуває здатності інгібувати біосинтез ДНК в клітинах лінії А-549.

Середовища, кондиційовані клітинами лінії А-549 протягом 1-4 годин після теплового шоку, інгібують синтез білків у цих клітинах, тоді як такі ж середовища, отримані протягом 6, 12 та 18 годин, стимулюють цей процес в 1,2-2,1 раз. Тимчасове закислення вище названих середовищ викликає підвищення їх здатності стимулювати синтез клітинних білків.

Аутокринні функції саркомних клітин лінії РС-103 /клон Зсб/ і псевдонормальних фібробластів лінії МІН-3Т3 після їх гіпертермічної обробки вивчали не лише в гомологічних тест-системах, але й з використанням гетерологічної клітинної системи, а саме карциномних клітин лінії А-549. Встановлено, що фібробласти лінії МІН-3Т3 вже у перші години після завершення теплового шоку секретують речовини, які інгібують біосинтез ДНК та білків у цих клітинах та в клітинах лінії А-549. У той же час саркомні клітини лінії РС-103 /клон Зсб/ такими властивостями не володіють. Крім того, показано, що тимчасове закислення середовищ, кондиційованих клітинами лінії МІН-3Т3, суттєво не впливає на їх здатність регулювати інтенсивність синтезу ДНК і білків, тоді як така обробка середовищ, кондиційованих клітинами лінії РС-103 /клон Зсб/, знижує їх біологічну активність щодо регуляції названих процесів.

### 8. Вплив ТФР- $\alpha$ , ЕФР та гіпертермічної обробки клітин на активність секретованих ними серинових протеїназ

Виявлено /рис.6/, що карциномні клітини лінії А-549, саркомні клітини лінії РС-103 /клон Зсб/ та псевдонормальні фібробласти лінії МІН-3Т3 секретують протеїнази у безсироваткове культуральне

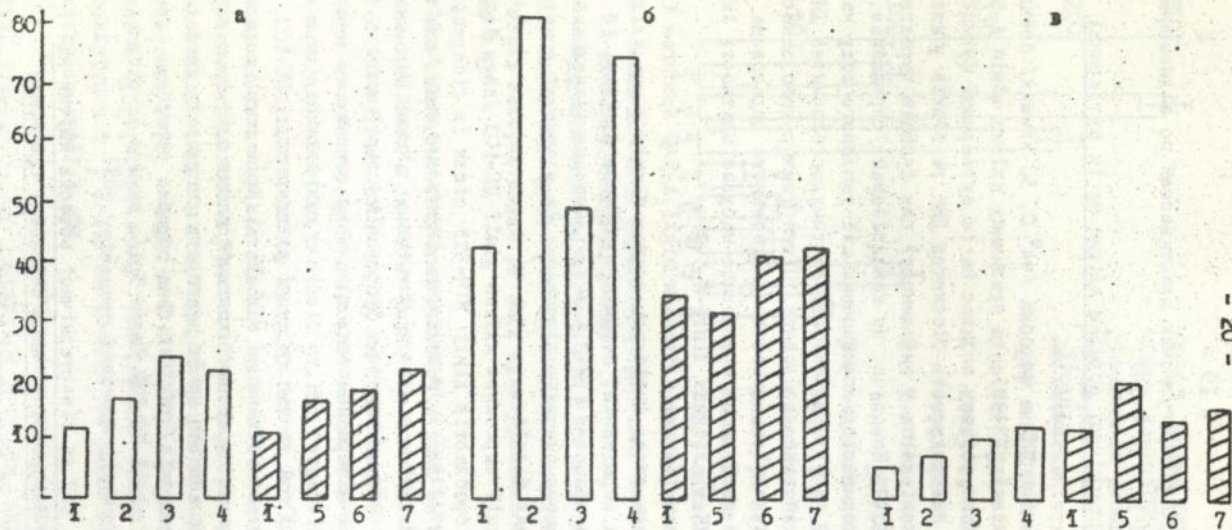


Рис. 6. Вплив ТФР-β і/чи/ ЕФР / □ / та гіпертермічної обробки клітин / ▨ / лінії А-549 /а/, РС-103 /клон 3сб/ /б/ і НІН-3ТЗ /в/ на активність плазміноподібних протеїназ в безсироватковому культуральному середовищі, кондиційованому цими клітинами /1 - контроль, 2 - ТФР-β /10 нг/мл/, 3 - ЕФР /10 нг/мл/, 4 - ТФР-β + ЕФР, 5 - через 2 години після теплового шоку, 6 - через 6 годин після теплового шоку, 7 - через 18 годин після теплового шоку клітин/

середовище. За даними проведеного нами інгібіторного аналізу /інгібування активності протеїназ у присутності бензамідину, лейпептину і апрогінину та відсутність такого ефекту при дії моноїод оцтової кислоти та EDTA/ та за специфічність використаного субстрату /Zd- ала-ала-фен-арг-паранітроанілід/ і низьков чутливість до стимуляції активності в присутності  $Ca^{2+}$  секретовані ферменти можна зарахувати до плазміноподібних серинових протеїназ.

З рис.6 видно, що активність серинових протеїназ у середовищі, кондиційованому саркомними клітинами, майже в 4 рази вища, ніж їх активність у такому ж середовищі карциномних та псевдонормальних клітин. ТФР- $\beta$  і особливо ЕФР викликають підвищення активності протеїназ у культуральному середовищі, кондиційованому клітинами лінії А-549. Подібна картина спостерігається й у випадку тестування фібробластів лінії НІН-3Т3. У той же час для саркомних клітин лінії РС-103 /клон 3сб/ саме ТФР- $\beta$  є найсильнішим індуктором підвищення активності серинових протеїназ, а дія ЕФР у даному випадку не виявляється.

Між саркомними та карциномними клітинами досліджуваних ліній виявлені відмінності в активності секретованих протеїназ і після гіпертермічної обробки клітин. Так, показано /рис.6/, що тепловий шок не впливає на активність цих протеїназ у саркомних клітин, але індукує її підвищення у карциномних клітин.

#### 9. Вплив ТФР- $\beta$ на синтез білків у клітинах

Одномірний електрофорез білків у поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію не виявив суттєвого впливу ТФР- $\beta$  /10 нг/мл/ на вміст окремих білкових фракцій у фібробластах лінії НІН-3Т3, а також у пухлинних клітинах лінії А-549 з аденокарциноми легень людини та лінії НТ-1080 з фібросаркомі людини. Для клітин перших двох названих ліній не виявлено впливу ТФР- $\beta$  і на біосинтез білків, що визначався за включенням ними  $^{35}S$ -метионіну. Цей висновок вірний як у випадку дії ТФР- $\beta$  на клітини, що культивувалися в середовищі, яке містило 10% сироватки крові плодів великої рогатої худоби, так і у випадку їх інкубації в безсироватковому середовищі. До речі, й сама сироватка крові суттєво не впливає на якісний склад білків, які синтезуються в клітинах ліній НІН-3Т3 та А-549.

Діючи на клітини лінії НТ-1080, що культивуються в безсироватковому середовищі, ТФР- $\beta$  індукує в них синтез білка з молекулярною масою близько 48 кДа /р48/. Синтез даного білка повністю інгібується під впливом циклогексїміду, але зберігається в присутності актиноміцину D. Встановлено, що синтез р48 індукується не лише ТФР- $\beta$ , але й сироваткою крові. Результати вивчення субклітинної

локалізації р48 свідчать про його переважне розміщення в клітинному осаді, що містить ядра та великі фрагменти клітин.

10. Вплив ТФР- $\beta$ , ЕФР та гіпертермічної обробки клітин на вміст м-РНК протоонкогенів c-шус і c-fos

З рис.7 видно, що ТФР- $\beta$ , ЕФР, а також їх суміш індукують транскрипції протоонкогена c-шус у фібробластах лінії НІН-3Т3, хоч час досягнення максимального рівня цього процесу під впливом ТФР- $\beta$  та ЕФР відрізняється. Тепловий шок викликає швидке /через 0,5 годин/ припинення синтезу м-РНК гена c-шус, після чого спостерігається його різке посилення, яке за інтенсивністю можна співставити з ефектами від дії ТФР- $\beta$  та ЕФР.

Дія ТФР- $\beta$  та ЕФР на клітини лінії НІН-3Т3 спочатку викликає у них зниження інтенсивності транскрипції протоонкогена c-fos, але через 1,5-3,0 годин відбувається її підвищення, що особливо помітне у випадку дії на клітини ЕФР /рис.7/. Подібна динаміка транскрипції гена c-fos виявлена також після гіпертермічної обробки клітин лінії НІН-3Т3.

Дівчи на саркомні клітини лінії РС-103 /клон 384/5/, ТФР- $\beta$ , ЕФР та їх суміш індукують зростання інтенсивності транскрипції протоонкогена c-шус /рис.8/. Її максимальний рівень виявляється через 1,5-3,0 годин після додачі факторів росту у середовище. Теплова обробка саркомних клітин також індукує цей процес, причому його максимум досягається вже через 0,5 годин.

Встановлено, що транскрипція протоонкогена c-fos у саркомних клітинах названої лінії під впливом ТФР- $\beta$  та ЕФР помітно зникає /рис.8/. Лише через 3 години після додачі факторів росту вихідний рівень транскрипції цього гена частково відновлюється. У той же час гіпертермічна обробка саркомних клітин індукує транскрипцію гена c-fos із максимумом через 1,5 години, а через 3 години після припинення теплового шоку спостерігається різке зниження інтенсивності цього процесу.

При дослідженні карциномних клітин лінії А-549 нами виявлена відмінність у результатах дії ТФР- $\beta$  на синтез м-РНК протоонкогена c-шус при інкубації клітин у присутності 10% сироватки крові плодів великої рогатої худоби та при інкубації клітин у її відсутності /рис.9/. Так, у першому випадку ТФР- $\beta$  індукує транскрипцію гена c-шус вже через 0,5 годин після додачі фактора росту, а в другому випадку вона змінюється несуттєво. Динаміка інтенсивності транскрипції гена c-шус у клітинах лінії А-549, що піддавалися гіпертермії, подібна до такої ж у клітинах при дії на них ТФР- $\beta$  у присутності 10% сироватки крові чи при дії його суміші з ЕФР у відсутності сироватки крові.

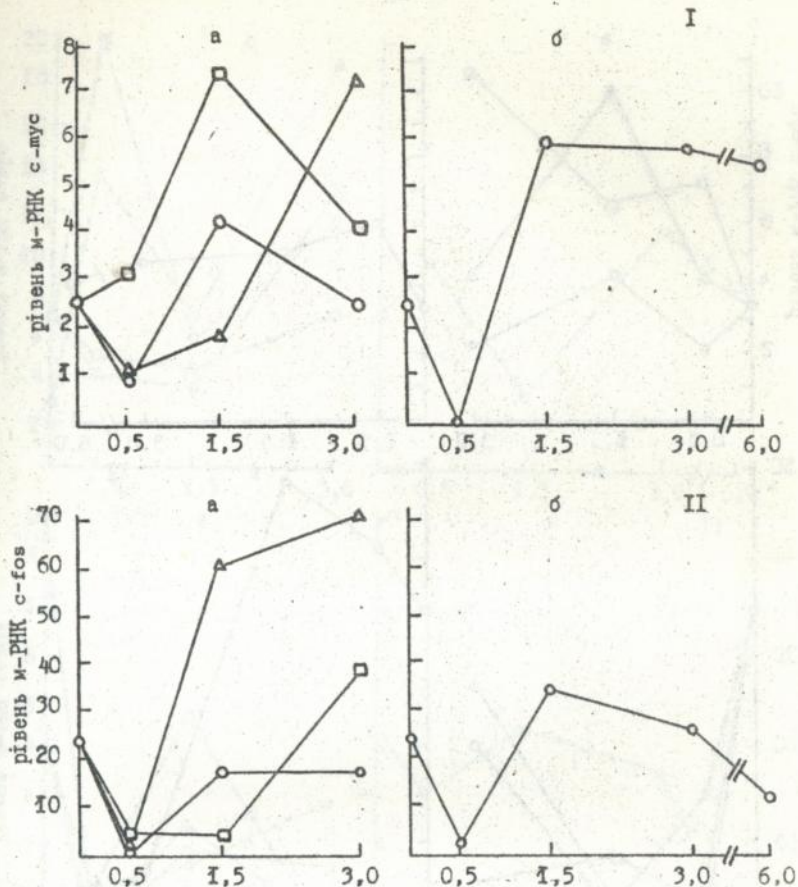


Рис. 7. Вплив поліпептидних факторів росту /а/ /ТФР-β /—○/, ЕФР /—△/, ТФР-β+ ЕФР /—□// та гіпертермічної обробки /б/ /44° С, 30 хвилин/ на рівень м-РНК протоонкогенів с-мус /I/ та с-fos /II/ у фібробластах лінії NIH-3Т3 /по осі ординат - відносна оптична густина, радіоавтографів при 600 нм, ...; по осі абсцис - час, години/

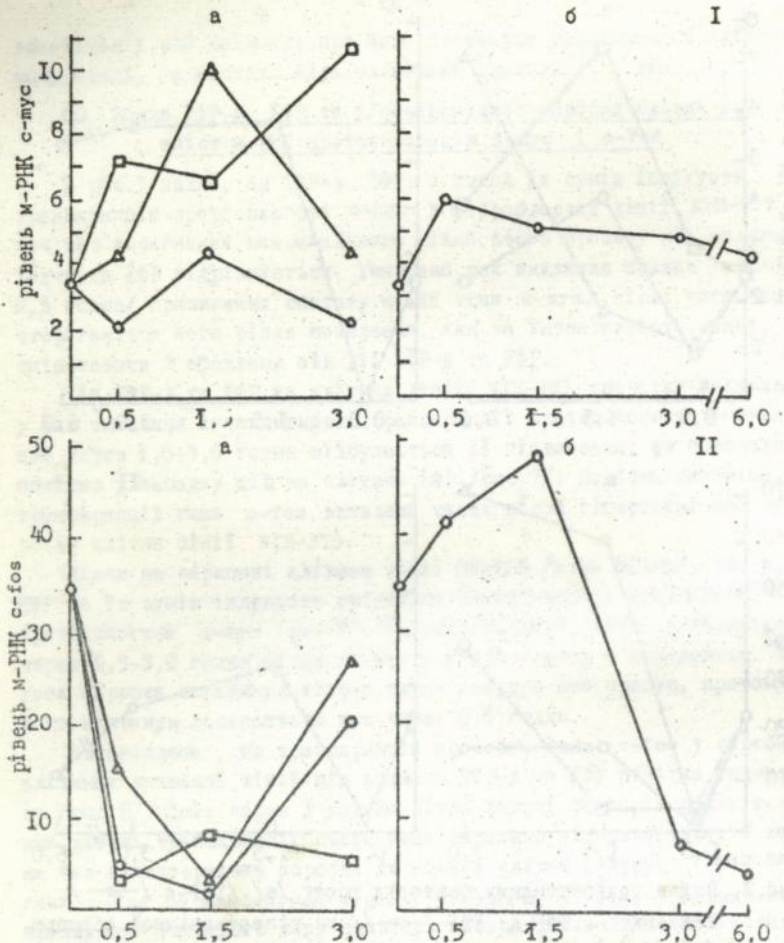


Рис. 8. Вплив поліпептидних факторів росту /а/ /TGF- $\beta$  /—○—/, EGF /—△—/, TGF- $\beta$  + EGF /—□—// та гіпертермічної обробки /б/ /44° С, 30 хвилин/ на рівень м-РНК протоонкогенів c-myc /I/ та c-fos /II/ у саркомних клітинах лінії PC-103 /клон 384/5/

/по осі ординат - відносна оптична густина радіоавтографів при 600 нм, %;

по осі абсцис - час, години/

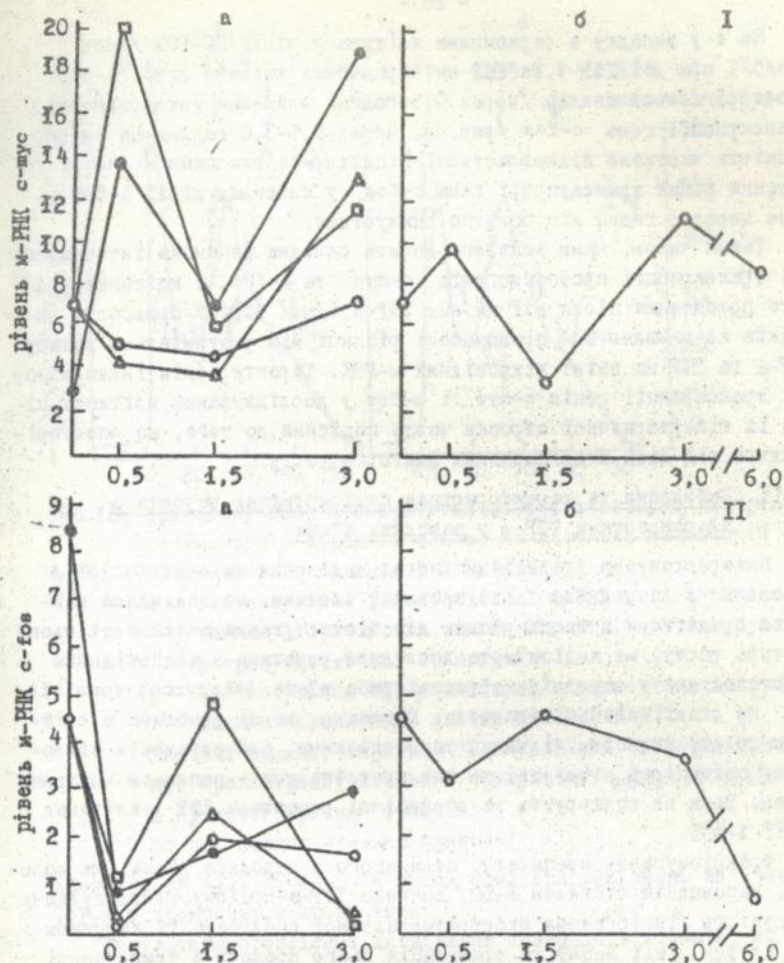


Рис.9. Вплив поліпептидних факторів росту /а/ /ТФР-β у безсироватковому культуральному середовищі /—○—/, ТФР-β у присутності 10% сироватки крові плодів великої рогатої худоби /—●—/, ЕФР /—△—/, ТФР-β + ЕФР /—□—// та гіпертермічної обробки /б/ /44° С, 30 хвилини/ на рівень  $\mu$ -РНК протоонкогенів с-мус /I/ та с-fos /II/ у карциномних клітинах лінії А-549

/по осі ординат - відносна оптична густина радіоавтографів при 600 нм, %;  
по осі абсцис - час, години/

Як і у випадку з саркомними клітинами лінії ПС-103 /клон 384/5/, при дії ТФР- $\beta$  та ЕФР на карциномні клітини лінії А-549 спостерігається швидке /через 0,5 годин/ зниження інтенсивності транскрипції гена *c-fos* /рис.9/. Через 1,5-3,0 години ця інтенсивність частково відновлюється. Гіпертермія викликає незначні коливання рівня транскрипції гена *c-fos* у клітинах лінії А-549 і лише через 6 годин він помітно знижується.

Таким чином, нами виявлена досить складна динаміка інтенсивності транскрипції протоонкогенів *c-myc* та *c-fos* у клітинах різного походження після дії на них ТФР- $\beta$  і/чи/ ЕФР. У більшості випадків не виявляється принципової різниці між результатами впливу ТФР- $\beta$  та ЕФР на вміст відповідних м-РНК. Характер змін інтенсивності транскрипції генів *c-myc* і *c-fos* у досліджуваних клітинах після їх гіпертермічної обробки часто подібний до того, що спостерігається під дією вищезазначених факторів росту.

#### II. Виявлення та характеристика поліпептидних речовин з властивостями ТФР- $\beta$ у зародках в'яна

Використовуючи традиційний метод виділення та очистки ТФР- $\beta$  (Roberts et al., 1984) та клітинні системи, що виявилися найбільш придатними в наших умовах для біотестування активності цього фактора росту, ми виділили та дослідили речовини з відповідними властивостями з зародків костистої риби в'яна (*Misgurnus fossilis* L.) на стадії пізньої бластули. Показано, що ці речовини є стійкими до дії кислоти, відносно термостійкими, але втрачають біологічну активність після дії на них протеїназами - пепсином чи трипсином. Вони не конкурують за специфічні рецептори ЕФР у клітинах лінії А-431.

Фракціонування препарату, отриманого з зародків в'яна, на колонії, наповнені біогелем Р-10, виявило ТФР- $\beta$ -подібну рістрегулюючу активність /інгібування субстратнезалежної проліферації карциномних клітин лінії А-549 та стимуляція цього процесу в присутності ЕФР у фібробластів лінії NIH-3T3/ у зоні елюції білків з молекулярною масою близько 5 та 12 кДа /рис.10/. У препараті, отриманому з бластодекти /клітинна маса зародка/ виявляється лише одна біологічно активна фракція з масою 12 кДа, а в такому ж препараті з жовтка рістрегулююча активність притаманна фракції з масою 5 кДа.

Як уже згадувалося вище, молекулярна маса ТФР- $\beta$  становить 25 кДа. Тому наведені нами дані можуть свідчити про затримку елюції з колонки з біогелем Р-10 ТФР- $\beta$ -подібних речовин, отриманих із зародків в'яна. Слід відзначити, що явище затримки в елюції ТФР- $\beta$  з колонок, наповнених біогелями Р-типу, вважається його характерною фізико-хімічною властивістю. Воно спостерігалось іншими авторами

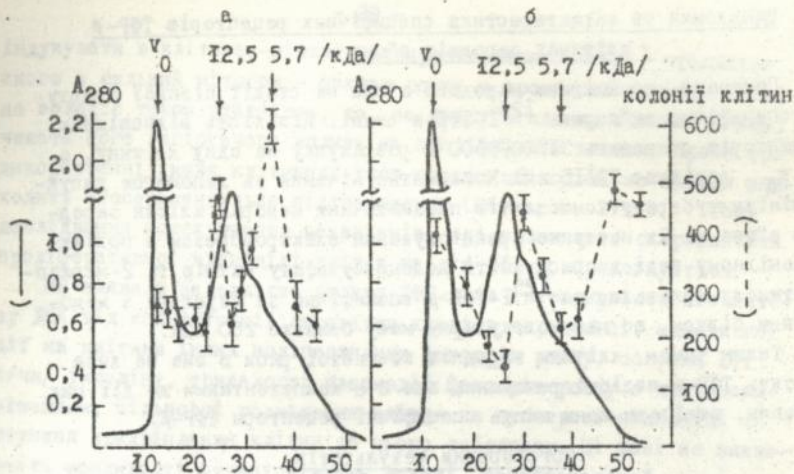


Рис. 10. Фракціонування препарату кислото-етанольного екстракту, отриманого з зародків в'юна, на колонці, наповненій біогелем Р-10 /елюція 1 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$ /  
 а - біотестування ТФР- $\beta$ -подібної активності з використанням фібробластів лінії МІВ-3ТЗ, що інкубуються в присутності ЕФР /5 нг/мл/  
 б - біотестування ТФР- $\beta$ -подібної активності з використанням карциномних клітин лінії А-549  
 /по осі ординат справа - інтенсивність субстратнезалежної проліферації клітин в присутності аліквот, відібраних із хроматографічних фракцій;  
 по осі абсцис - номер фракцій/

(Roberts et al., 1984), а також нами при виділенні та очищенні ТФР- $\beta$  з тромбоцитів крові свині.

Результати проведених досліджень дозволяють вважати, що протеазочутливі речовини, отримані з зародків в'юна, належать до родини поліпептидів, які споріднені з ТФР- $\beta$ . Адже нами показано, що ці речовини діють з тією ж скерованістю, що й ТФР- $\beta$  свині, в 3-х різних клітинних тест-системах. Так, вони стимулюють субстратнезалежну проліферацію саркомних клітин лінії РС-103 /клон 384/5/ та фібробластів лінії МІВ-3ТЗ /останній ефект виявляється лише в присутності ЕФР/, а також інгібує проліферацію карциномних клітин лінії А-549.

## 12. Виявлення та характеристика специфічних рецепторів ТФР- $\beta$ у клітинах зародків в"вна

Показано, що клітини зародків в"вна на стадії пізньої бластули специфічно зв"язують  $^{125}\text{I}$ -ТФР- $\beta$  свині. Кількість відповідних рецепторів становить  $31300 \pm 5500$  з розрахунку на одну клітину, а їх  $K_d$  дорівнює  $70 \pm 15$  пМ. Ковалентне мічення за допомогою дисуццинімідилсульбату компонентів плазматичних мембран клітин зародків в"вна та їх наступне фракціонування електрофорезом в поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію та 2-меркаптоетанолю показало, що  $^{125}\text{I}$ -ТФР- $\beta$  специфічно зв"язується з мембранним білком, що має молекулярну масу близько 280 кДа.

Таким чином, клітини зародків костистої риби в"вна не лише містять ТФР- $\beta$ -подібні речовини, але й є компетентними до дії цих речовин, оскільки вони мають специфічні рецептори ТФР- $\beta$ .

### Обговорення результатів

Результати проведених нами досліджень та дані інших авторів (Roberts et al., 1985, Goustin et al., 1986, Massague, 1990) свідчать про те, що ТФР- $\beta$  може не лише стимулювати, але й інгібувати проліферацію нормальних і пухлинних клітин тварин і людини. Характер рістрегулюючої дії цього фактора росту в значній мірі залежить від тканинного походження клітин-мішеней. ТФР- $\beta$  стимулює субстратнезалежну проліферацію клітин із саркомних пухлин, інгібує її у клітин із карциномних пухлин і не впливає на цей процес у псевдонормальних фібробластних клітин.

Нами також встановлено, що скерованість впливу ТФР- $\beta$  на проліферацію може залежати від клонального походження клітин. Серед саркомних клітин лінії PC-103 виявлено такі, проліферація яких не стимулюється, а інгібується під впливом ТФР- $\beta$ . Це - клітини субклону клону 384/5, для яких характерна висока інтенсивність субстратнезалежної проліферації. Отже при розробці рекомендацій по застосуванню ТФР- $\beta$  з метов інгібування пухлинного росту необхідно обов"язково враховувати можливість існування міжклональних відмінностей між клітинами в їх чутливості до рістрегулюючої дії ТФР- $\beta$ .

Слід відзначити, що в літературі описані мутанти карциномних клітин лінії CCI-64, які втратили здатність інгібуватися під впливом ТФР- $\beta$  (Laiho et al., 1990). Таким чином, не лише саркомні, але й карциномні пухлини можуть містити клітини, що характеризуються різко зміненою чутливістю до дії даного фактора росту.

Leof et al. (1986), виходячи з результатів вивчення дії ТФР- $\beta$  на фібробласти лінії AKR-2B, вважають, що даний фактор росту стимулює проліферацію лише у тих випадках, коли він здатний

індукувати в клітинах-мішенях експресію гена *c-sis*, продуктом якого є сильний мітоген - фактор росту з тромбоцитів. Якщо ТФР- $\beta$  не володіє такою здатністю, то, на думку згаданих вчених, можна чекати його інгібувального впливу на проліферацію клітин. Проте при використанні інших клітинних тест-систем ця модель не завжди знаходить експериментальне підтвердження (Massague, 1990). Тому дослідження молекулярних механізмів, які визначають скерованість проліферативної відповіді клітин на дію ТФР- $\beta$ , продовжуються.

Ми виявили залежність впливу ТФР- $\beta$  на інтенсивність біосинтезу ДНК від концентрації сироватки крові в середовищі, одночасної дії на клітини інших поліпептидних факторів росту, зокрема ЕФР і/чи/ інсуліну, тривалості взаємодії факторів росту з клітинами-мішенями, щільності розміщення клітин на субстраті-підкладці та ступеня прикріплення клітин до цього субстрату. Ці дані не виключають можливості функціонування моделі, запропонованої

Leaf et al. (1986). Разом з тим вони свідчать про важливу роль інших регуляторних систем клітин-мішеней та клітинного мікроочередження у визначенні характеру дії ТФР- $\beta$  на проліферацію.

Нами проведено порівняння функціонування деяких регуляторних систем, що локалізовані в головних компартментах - у плазматичній мембрані, цитоплазмі та ядрі - клітин, які характеризуються різноманітністю за скерованістю та вираженістю проліферативної відповіддю на дію ТФР- $\beta$ . Одночасно були вивчені деякі властивості позаклітинного середовища цих клітин, зокрема наявність у ньому секретованих клітинами факторів росту та плазміноподібних протеїназ. Увага до останніх зумовлена тим, що вони можуть брати участь у процесах "демаскування" ТФР- $\beta$  з його латентної форми (Lyons et al., 1988).

Результати вивчення умов та факторів, які можуть визначати характер рідрегулювальної дії ТФР- $\beta$  на нормальні і пухлинні клітини тварин і людини, узагальнені в таблиці 3. Врахування наведених даних дозволяє передбачити з великим ступенем ймовірності скерованість впливу ТФР- $\beta$  на клітинну проліферацію. Є підстави вважати, що ТФР- $\beta$  стимулює проліферацію клітин, які походять із мезенхімальних тканин і мають відносно низьку проліферативну активність. Ці клітини характеризуються значною кількістю /понад 10 тисяч/ специфічних рецепторів ТФР- $\beta$ , серед яких переважають їх високомолекулярні форми. В даних клітинах повинен експресуватися протоонкоген *c-myc*, а також гени мітогенних факторів і/чи/ їх рецепторів. Стимулюючий вплив ТФР- $\beta$  на проліферацію нормальних клітин цього типу виявляється лише за умов одночасної дії на них ЕФР і/чи/ інсуліну. Активність плазміноподібних протеїназ; позаклітинному середовищі цих клітин може бути досить високою. Для вияв-

Таблиця 3.

Умови, що впливають на скерованість та вираженість рістрегулювчої дії ТФР- $\beta$  на клітини-мішені

№п/п: Умови, від яких залежить характер впливу ТФР- $\beta$ на проліферацію : : клітин	: Вплив ТФР- $\beta$ на : : проліферацію	: Джерело : : цитування
I :	2	3 : 4
I Походження клітин-мішеней:		
а/ тканинне: - мезенхімні тканини - епітеліальні тканини		стимуляція інгібування наші дані, 2, 4, 7
б/ клональне: - саркомні клітини з низькою проліферативною активністю - саркомні клітини з високою проліферативною активністю		стимуляція інгібування наші дані
2 Система клітинних рецепторів ТФР- $\beta$ :		
а/ кількість рецепторів у клітині: >10 тисяч <10 тисяч		стимуляція інгібування наші дані, 8
б/ переважаччі молекулярні форми рецепторів: >200 кДа <100 кДа		стимуляція інгібування 4
3 <sup>м</sup> Функціональний стар клітин-мішеней:		
а/ проліферативна активність: поміркована висока		нема впливу або стимуляція інгібування наші дані
б/ експресія гена с-мус /клітини лінії СЗН/10Т1/2/ експресується не експресується		стимуляція інгібування 9

див. продовження

1 :	2	:	3	:	4
в/експресія м-РНК факторів росту чи їх рецепторів під впливом ТФР- $\beta$	індукується не індукується		стимуляція нема ефекту або інгібування		1, 3, 4
г/відношення внутрішньоклітинних концентрація [cAMP] / [cGMP]	>10 <10		нема ефекту інгібування		наші дані
4* Властивості позаклітинного середовища:					
а/концентрація ТФР- $\beta$ /клітини гладеньких м'язів/	> 0,1 нг/мл < 0,1 нг/мл		стимуляція нема ефекту		1
б/концентрація сироватки крові /карциномні клітини лінії А-549/	10% 0,1%		інгібування стимуляція		наші дані
в/наявність інших факторів росту /псевдонормальні фібробласти/	ЕФР і/чи/ інсулін нема		стимуляція нема ефекту		наші дані, 6
г/наявність поліненасичених жирних кислот /карциномні клітини лінії А-549/	е  нема		90-100% інгібуван- ня 15-33% інгібування		5
д/активність секретованих клітинами плазміноподібних протеїназ	висока низька		стимуляція інгібування або нема ефекту		наші дані
е/властивості субстрату-підкладки	колаген нема колагену		інгібування слаба стимуляція		5

див. продовження

I :	2	3	4
ε/ступінь прикріплення клітин до субстрату- підкладки /карциномні клітини лінії А-549/	моношарова культура напіврідкий агар	15% інгібування 90% інгібування	наші дані
ж/щільність клітин в культурі /фібробласти лінії swiss-3T3 в сироватці з 0,1% сироватки крові та ЕФР/	10 <sup>5</sup> клітин/2 см <sup>2</sup> 10 <sup>4</sup> клітин/2 см <sup>2</sup>	нема ефекту інгібування	наші дані
5* Тривалість взаємодії ТФР-β клітинами /фібробласти лінії m1n-3T3 в сироватці з 6% сироватки крові та ЕФР/	24 години 72 години	нема ефекту інгібування	наші дані

\* - можливе виявлення інших прикладів неоднозначності пістрегульовчої дії ТФР-β

/джерела цитування: 1 - Battegay et al., 1990, 2 - Goustin et al., 1986, 3 - Leof et al., 1986, 4 - Massague, 1990, 5 - Newman, 1990, 6 - Roberts, Sporn, 1985, 7 - Sporn et al., 1986, 8 - Wakefield et al., 1987, Wenner et al., 1990)

лення залежності впливу ТФР- $\beta$  на проліферацію клітин від властивостей підкладки, ступеня прикріплення до неї клітин-мішеней, їх щільності з розрахунку на одиницю площі поверхні підкладки та від тривалості дії ТФР- $\beta$  на клітини, очевидно, необхідні додаткові дослідження.

Проведений нами аналіз дозволив також визначити клітини, проліферація яких інгібується під впливом ТФР- $\beta$ . Це - нормальні та пухлинні клітини епітеліального походження, а також саркомні клітини, які характеризуються високою інтенсивністю субстратнезалежної проліферації. Дані клітини повинні мати відносно малу кількість /менше, ніж 10 тисяч/ специфічних рецепторів ТФР- $\beta$ , серед яких переважають їх низькомолекулярні форми. Під дією ТФР- $\beta$  експресія протоонкогена *c-myc* у цих клітинах може інгібуватися, а експресія *m-RNK* мітогенних факторів і/чи їх рецепторів не індукуються. Відношення внутрішньоклітинних концентрацій [cAMP]/[cGMP] не досягає тут великих значень через високий вміст cGMP. Інгібувальний ефект ТФР- $\beta$  спостерігається за умов хорошої забезпеченості клітин сироватковими факторами росту, причому наявність в середовищі поліненасичених жирних кислот суттєво підсилює його вираженість. Активність плазміноподібних протеїназ, що секретируются цими клітинами, є відносно низькою. Не можна повністю виключити значення й інших умов у визначенні скерованості впливу ТФР- $\beta$  на проліферативну активність клітин даного типу.

Виходячи з результатів проведених нами досліджень, можна також вважати, що біологічні особливості ТФР- $\beta$  дозволяють йому в залежності від обставин його дії змінювати скерованість впливу на проліферативну активність тих самих клітин-мішеней. Наприклад, показано, що за умов високої проліферативної активності клітин ТФР- $\beta$ , як правило, інгібує ріст. У той самий час за умов, несприятливих для проліферації /карциномні клітини лінії А-549, поміщені в середовище з дефіцитом сироватки крові/, цей фактор стимулює біосинтез ДНК. Ці властивості ТФР- $\beta$  слід також враховувати при розробці рекомендацій по створенню фармакологічних препаратів, в яких ТФР- $\beta$  у поєднанні з деякими іншими факторами росту пропонується для використання в медицині.

Ми виявили поліпептидні речовини з властивостями ТФР- $\beta$  у зародках костистої риби - в'юна. Крім того, в клітинах цих зародків знайдені специфічні рецептори ТФР- $\beta$ . Раніше у представників класу риб ТФР- $\beta$  не виявлявся. Слід також відзначити, що наша робота є першою, в якій ТФР- $\beta$ -подібні речовини були знайдені в зародках на такій ранній стадії розвитку, як бластула.

В останні роки отримані дані про наявність генів ТФР- $\beta$  та генів подібних до нього речовин у птахів (Roberts et al., 1991), амфібії (Rebert et al., 1990) та комах /дрозофіла/ (Padgett et al., 1987). Показано, що ТФР- $\beta_2$  може відігравати центральну роль у процесах індукції мезодерми та тканин, які виникають з неї у амфібії (Rosa et al., 1988). Вважається, що морфогенетична активність притаманна і поліпептидному продукту гена, що виявлений у дрозозфіли і гомологічний гену ТФР- $\beta_1$  людини (Massague, 1990).

Отже ТФР- $\beta$  чи подібні до нього поліпептиди можуть виконувати важливі регуляторні функції під час усіх етапів онтогенезу не лише у ссавців та нижчих хребетних, але й у безхребетних тварин.

### Висновки

1. ТФР- $\beta$  стимулює субстратнезалежну проліферацію клітин зі саркомних пухлин, інгібує її у клітин з карциномних пухлин та не впливає на неї у псевдонормальних фібробластних клітин. Виявлений субклон саркоми лінії ПС-103, проліферація клітин якого інгібується під впливом ТФР- $\beta$ .

2. Не тільки ЕФР, але й інсулін модулює вплив ТФР- $\beta$  на проліферативну активність клітин. Проліферація псевдонормальних клітин лінії СНО-719, що не мають специфічних рецепторів ЕФР, стимулюється лише під час спільної дії ТФР- $\beta$  та інсуліну.

3. За умов моношарової культури характер впливу ТФР- $\beta$  на інтенсивність біосинтезу ДНК залежить не лише від типу клітин-мішеней, але й від концентрації ТФР- $\beta$  та сироватки крові в середовищі наявності в ньому ЕФР і/чи/ інсуліну, тривалості дії вказаних факторів росту та щільності клітин на субстраті-підкладці. Зміна навіть однієї з перерахованих умов може впливати не лише на вираженість, але й на скерованість рістрегулюючої дії ТФР- $\beta$  на клітини-мішені.

4. Псевдонормальні клітини лінії NRK-49P та карциномні клітини лінії А-549 суттєво відрізняються між собою не лише за кількістю специфічних рецепторів ТФР- $\beta$ , але й за характером трансмодуляції цих рецепторів під впливом ЕФР і/чи/ інсуліну. В клітинах першої з названих ліній інсулін підвищує рівень специфічного зв'язування ТФР- $\beta$ , а інсулін разом з ЕФР знижує його. В клітинах другої лінії ЕФР збільшує рівень зв'язування ТФР- $\beta$ .  $K_d$  рецепторів ТФР- $\beta$  при цьому не змінюється.

5. Відношення внутрішньоклітинних концентрацій [cAMP] / [cGMP] можна використовувати для прогнозування проліферативної активності нормальних та опухолевих клітин. У карциномних клітин лінії А-549 цей показник дорівнює 3,4, тоді як у псевдонормальних клітин ліній НІН-3Т3 та NRK-49P - відповідно 34,7 та 103,8. ТФР- $\beta$  несуттєво

впливає на відношення [cAMP]/[cGMP] у клітин лінії A-549, але значно підвищує його у клітин ліній NIH-3T3 та NRK-49F.

6. Клітини з різним характером проліферативної відповіді на діє ТФР- $\beta$ /карцинома лінії A-549, саркома лінії PC-103/клон 3сб/ та псевдонормальні фібробласти лінії NIH-3T3/ відрізняються між собою за активностями секретованих ними факторів росту та плазмінноподібних протеїназ. Активність останніх є найвищою в середовищі, кондиційованому саркомними клітинами. ТФР- $\beta$ , ЕФР та гіпертермія можуть впливати на цю активність.

7. Гіпертермічна обробка клітин модулює їх здатність секретувати речовини з властивостями факторів росту. У пухлинних клітин ця аутокринна функція виражена сильніше, ніж у псевдонормальних клітин.

8. Гіпертермія впливає на вміст м-РНК протоонкогенів c-myc і c-fos. Зміни, що виявляються при цьому, подібні на ті, які індукуються в клітинах ТФР- $\beta$  і/чи/ ЕФР. Характер цих змін під впливом ТФР- $\beta$  не відображає їх прямої кореляції з дією даного фактора росту на проліферацію клітин.

9. Проведене комплексне вивчення впливу ТФР- $\beta$  на функціонування регуляторних систем, що локалізовані в плазматичній мембрані, цитоплазмі та ядрі псевдонормальних фібробластів, саркомних та карциномних клітин. Отримані результати дозволяють вважати, що проліферативна відповідь клітин на діє ТФР- $\beta$  залежить від їх морфофункціонального стану, особливостей мікрооточення та умов застосування даного фактора росту.

10. Функції клітин ранніх зародків риби можуть регулюватися ТФР- $\beta$  або гомологічними факторами росту. На це вказує виявлення поліпептидних речовин з властивостями ТФР- $\beta$  та специфічних рецепторів даного фактора росту в зародках костистої риби в'яна.

#### Список основних робіт, опублікованих по темі дисертації

1. Кусень С.И., Стойка Р.С. Молекулярные механизмы в действии полипептидных факторов роста. - Москва: Наука, 1985. - 236 с.
2. Стойка Р.С., Кусень С.И., Федисин Я.Я., Сумельницький С.И. Полипептидные факторы роста зародышей в'яна// VII Всесоюзное совещание эмбриологов: Тез. докл., ч.II, М., 1986. - С.98.
3. Стойка Р.С., Федисин Я.Я., Сумельницький С.И. Полипептидні фактори росту в ранньому ембріогенезі та при злоякісній трансформації клітин// Укр. біохім. з'їзд: Тези допов., ч.І, - Київ, 1987. - С.149-150.
4. Сумельницький С.І., Стойка Р.С., Гарасько С.Я. Часткова очистка та деякі властивості  $\beta$ -типу трансформуючого фактора росту тромбоцитів свині// Укр. біохім. з'їзд: Тези допов., ч.2, - Київ,

1987. - С.249.
5. Кусень С.И., Стойка Р.С. Современные представления о молекулярных механизмах действия инсулина на клетки животных и человека// IY съезд эндокринологов Укр.ССР: Тез. докл. - Киев, 1987. - С.212-213.
  6. Гойда Е.А., Медына И.Р., Стойка Р.С., Федисин Я.Я. Влияние полипептидных факторов роста из зародышей вьюна на ионную проводимость их клеточных мембран// IY съезд эндокринологов Укр.ССР: Тез. докл. - Киев, 1987. - С.89.
  7. Стойка Р.С., Федисин Я.Я., Сумельницкий С.И., Гарасько С.И., Микитюк Р.Г. Полипептидные факторы роста в раннем эмбриогенезе животных// Всесоюзный симп. "Молекулярные и функциональные механизмы онтогенеза": Тез. докл. - Харьков, 1987. - С.172-173.
  8. Стойка Р.С., Кусень С.И., Федисин Я.Я., Сумельницкий С.И. Полипептидные факторы роста зародышей вьюна на стадии бластулы// Укр. биохим. ж. - 1987. - 59, №5. - С.27-32.
  9. Стойка Р.С., Сумельницкий С.И., Кусень С.И. Особенности регуляторного действия трансформирующего фактора роста  $\beta$ // II Всесоюзное совещание по изучению роли морфогенетически активных факторов в различных процессах: Пушино, 1988: Онтогенез. - 1988. - 19, №5. - С.552-553.
  10. Стойка Р.С., Кусень С.И. Трансформирующие факторы роста// Усп. совр. биол. - 1988. - 106, №1/4/. - С.69-84.
  11. Стойка Р.С., Кусень С.И. Полипептидные факторы роста в эмбриогенезе животных// Онтогенез. - 1988. - 19, №3. - С.229-239.
  12. Стойка Р.С. Трансформирующий фактор роста  $\beta$ -типа// Укр. биохим. ж. - 1988. - 60, №5. - С.91-103.
  13. Stoika R.S., Sushelnitsky S.I., Kusen S.I. The influence of transforming growth factor  $\beta$ , epidermal growth factor and insulin on cell proliferation in the media with semisolid agar// Fourth Internat. Congress of Cell Biology: Abstr. - Montreal, Canada, 1988. - P.108.
  14. Stoika R.S., Drobot L.B., Pedishin Ya.Ya., Yurzhonko V.S., Kusen S.I. Polypeptide growth factors from loach embryos stimulate tyrosine phosphorylation in membrane proteins// Fourth Internat. Congress of Cell Biology: Abstr.-Montreal, Canada, 1988.- P.108.
  15. Стойка Р.С., Сумельницкий С.И., Кусень С.И. Влияние трансформирующего фактора роста  $\beta$ , эпидермального фактора роста и инсулина на пролиферацию клеток в среде с полужидким агаром// Биополимеры и клетка. - 1989. - 5, №1. - С.96-99.
  16. Стойка Р.С. Филогенетические особенности структуры и функции полипептидных факторов роста, локализованных в кровяных пластинках

- млекопитающих// Ж. эвол. биохим. и физиол. - 1989. - 25,  
№3. - С.373-379.
17. Сумельницкий С.И., Стойка Р.С., Гарасько С.И., Шафранская Г.И., Кусень С.И. Влияние трансформирующего фактора роста  $\beta$ -типа и его комбинаций с эпидермальным фактором роста и инсулином на субстратнезависимую пролиферацию нормальных и опухолевых клеток// Цитология. - 1989. - 31, №7. - С.767-774.
18. Федисин Я.Я., Стойка Р.С., Кусень С.И. Обнаружение протеазочувствительных факторов со свойствами трансформирующего фактора роста  $\beta$ -типа в ранних зародышах вьюна// Онтогенез. - 1990. - 21, №1. - С.63-68.
19. Стойка Р.С., Сумельницкий С.И., Кусень С.И. Регуляторное действие трансформирующего фактора роста  $\beta$  на пролиферацию клеток в зависимости от условий тестирования его активности// Всесоюзное совещание "Актуальные вопросы клеточной биологии" / Ленинград, 1989/: Цитология. - 1989. - 31, №9. - С.1127-1128.
20. Стойка Р.С., Федисин Я.Я., Кусень С.И. Факторы роста со свойствами трансформирующего фактора роста  $\beta$  в ранних зародышах вьюна // Всесоюзное совещание "Актуальные вопросы клеточной биологии" / Ленинград, 1989/, Цитология. - 1989. - 31, №9. - С.1128.
21. Ставровская А.А., Стойка Р.С., Стромская Т.П., Сумельницкий С.И. Идентификация фактора роста, продуцируемого клетками саркомы мыши, вызванной инородным телом// Всесоюзное совещание "Актуальные вопросы клеточной биологии" / Ленинград, 1989/, Цитология. - 1989. - 31, №9. - С.1126.
22. Сумельницкий С.И., Стойка Р.С. Изучение влияния эпидермального фактора роста и инсулина на специфическое связывание трансформирующего фактора роста  $\beta$  нормальными и опухолевыми клетками// Всесоюзное совещание "Актуальные вопросы клеточной биологии" / Ленинград, 1989/, Цитология. - 1989. - 31, №9. - С.1129.
23. Стойка Р.С. функциональные особенности трансформирующего фактора роста  $\beta$ // Всесоюзное совещание "Актуальные вопросы клеточной биологии" / Ленинград, 1989/, Цитология. - 1989. - 31, №9. - С.1127.
24. Stoika R.S., Fedishin Ya.Ya., Kusen S.I. Teleost fish loach early embryos contain substances with activities of transforming growth factor  $\beta$ // 19th FEBS Meeting: Abstr. - Rome, Italy, 1989.
25. Sushelnitsky S.I., Stoika R.S., Kusen S.I. The influence of EGF and insulin on TGF- $\beta$  action on the proliferation of carcinoma (A-549) and normal (NRK-49F) cells// 19th FEBS Meeting: Abstr. - Rome, Italy, 1989.
26. Стойка Р.С., Сумельницкий С.И., Кусень С.И. Особенности регуляторного действия трансформирующего фактора роста  $\beta$ // Морфогенети-

- чески активные вещества /сборник/, Научный центр биол. исследований Ин-та биол. физики АН СССР, Пушкино, 1990. - С.107-113.
27. Савровская А.А., Стромская Т.П., Бродская Р.М., Стойка Р.С., Сушельницкий С.И., Гараско С.И., Шафранская Г.И. Клетки мышечной саркомы, индуцированной полимерной пластинкой, секретируют трансформирующий фактор роста  $\alpha$ -типа// Экспер. онкология. - 1990. - 12, №2. - С.43-46.
28. Стойка Р.С., Сушельницкий С.И., Кусень С.И. Влияние трансформирующего фактора роста  $\beta$  на интенсивность синтеза ДНК клеток в зависимости от их типа и условий культивирования// Цитология. - 1990. - 32, №2. - С.132-139.
29. Стойка Р.С., Кусень С.И. Трансформирующий фактор роста  $\beta$  - новый тип ингибитора пролиферации нормальных и опухолевых клеток// Молек. биология. - 1990. - 24, №4. - С.897-906.
30. Stoika R.S., Sushelnitsky S.I., Kusen S.I. The regulation of proliferation of human lung adenocarcinoma cells of A-549 line by autocrine growth factors// 20th FEBS Meeting: Abstr. - Budapest, Hungary, 1990. - P.300.
31. Sushelnitsky S.I., Stoika R.S., Kusen S.I. The regulation of specific binding of transforming growth factor  $\beta$  by the cells of NRK-49F line// 20th FEBS Meeting: Abstr. - Budapest, Hungary, 1990. - P.303.
32. Сушельницкий С.И., Стойка Р.С. Изучение кинетических параметров специфического связывания трансформирующего фактора роста  $\beta$  клетками линии NRK-49F из нормальной почки крысы// Биол. мембраны. - 1991. - 8, №6. - С.628-632.
33. Сушельницкий С.И., Стойка Р.С., Кусень С.И. Влияние эпидермального фактора роста и инсулина на специфическое связывание трансформирующего фактора роста  $\beta$  клетками линий NRK-49F и A-549// Цитология. - 1991. - 33, №3. - С.80-87.
34. Чупашко О.Я., Воробец З.Д., Стойка Р.С., Лычковский З.И. Модуляция транспорта кальция в мышечные фибробласты линии N1P-3T3 и клетки линии A-549 аденокарциномы легких человека трансформирующим фактором роста  $\beta$  и эпидермальным фактором роста// Доклады АН Украины, сер.Б. - 1991. - №7. - С.141-144.
35. Stoika R.S., Sushelnitsky S.I., Yakimovich I.A., Fedishin Ya. Ya., Kusen S.I. The factors with the properties of transforming growth factor  $\beta$  and fibroblast growth factor in the early leach embryos// Soviet-Finnish Symposium on Developmental Biology (Suzdal, 1991), Онтогенез. - 1991. - 22, №4. - С.407.

36. Стойка Р.С., Сусельницький С.И., Корчинский А.Г. Изучение механизмов, определяющих направленность в регуляции пролиферации клеток трансформирующим фактором роста  $\beta$  // Рабочее совещание. "Морфоген-3" / Пушино, 1992/, Онтогенез. - 1992. - 23, №3. - С.315-316.
37. Корчинський О.Г., Стойка Р.С., Гарасько С.Й., Шафранська Г.І. Аутокринна регуляція біосинтезу ДНК і білків в період відновлення клітинних функцій після дії теплового шоку// УІ Укр. біохім. з"їзд: Тези допов. ч.І. - Київ, 1992. - С.193.
38. Стойка Р.С., Сусельницький С.І., Кусень С.И. Дослідження молекулярних механізмів дії трансформуючого фактора росту  $\beta$  на клітини тварин і людини// Укр. біохім. з"їзд: Тези допов. ч.І. - Київ, 1992. - С.230.
39. Стойка Р.С., Сусельницький С.И., Гарасько С.И., Шафранская Г.И., Кусень С.И. Аутокринная регуляция пролиферации клеток линии А-549 из аденокарциномы легких человека в условиях, способствующих закислению культуральной среды// Цитология. - 1992. - 34, №5. - С.88-93.
40. Сусельницький С.И., Стойка Р.С., Кусень С.И. Влияние трансформирующего фактора роста  $\beta$ , эпидермального фактора роста и инсулина на соотношение цАМФ и цГМФ в нормальных и опухолевых клетках// Экспер. онкология. - 1992. - 14, №6. - С.32-35.
41. Стойка Р.С., Сусельницький С.И., Кусень С.И. Влияние трансформирующего фактора роста типа  $\beta$ , эпидермального фактора роста и инсулина на субстратнезависимую пролиферацию клеток саркомы мышей// Экспер. онкология. - 1992. - 14, №4. - С.30-33.
42. Стойка Р.С., Сусельницький С.И., Кусень С.И. Влияние трансформирующего фактора роста  $\beta$ , эпидермального фактора роста и инсулина на биосинтез ДНК в мышечных фибробластах линии Swiss-3T3 при низкой и высокой плотности клеток в монослойной культуре// Биополимеры и клетка. - 1992. - 8, №4. - С.39-43.
43. Stoika R.S., Antoniv T.T., Sushelnitsky S.I., Kusen S.I. The influence of transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) and epidermal growth factor (EGF) on the intensity of c-fos gene expression in normal fibroblasts and in sarcoma and carcinoma cells// Internat. Symposium "Structure and function of regulatory polypeptides": Abstr. - Moscow, 1992. - P.77.

44. Стойка Р.С., Антонив Т.Т. Влияние трансформирующего фактора роста  $\beta$  ТФР- $\beta$ / и эпидермального фактора роста /ЭФР/ на экспрессию протоонкогенов *c-myc* и *c-fos* в клетках, различающихся по направленности их пролиферативного ответа на действие ТФР- $\beta$ // VI съезд общества генетиков и селекционеров им.Н.И.Вавилова: Материалы съезда, ч.1. - Минск, 1992. - С.30.
45. Корчинский А.Г., Стойка Р.С., Кусень С.И. Тепловой шок модулирует способность клеток линии А-549 из аденокарциномы легких человека аутокринно регулировать интенсивность биосинтеза ДНК и белков// Биохимия. - 1992. - 57, #II. - С.1642-1647.
46. Стойка Р.С., Дробот Л.Б., Сухельницкий С.И., Врженко В.С., Кошельник Ю.Р., Кусень С.И. Клетки ранних зародышей мыши связывают трансформирующий фактор роста  $\beta$  // Онтогенез. - 1993. - 24, №1. - С.38-42.



Нідписано до друку 21.12.92. Формат 60x90/16. Друк.офс.Папір офс.

Друк.арк.2,32.Ум.фарб.відб.2,54.Обл.-вид.арк. 2,29

Тираж 100 прим. Зам.3453.

Обласна книжкова др укарня, 290000, Львів, вул. Стефаника, 11.



AB 26.639

**AB 26.639**