

УКРАЇНСЬКА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ТА БІОХІМІЇ ТВАРИН

На правах рукопису

КОРЧИНСЬКИЙ
Олександр Геннадійович

АУТОКРИННА РЕГУЛЯЦІЯ СИНТЕЗУ ДНК
ТА БІЛКІВ У НОРМАЛЬНИХ ТА ПУХЛИННИХ
КЛІТИНАХ ПІСЛЯ ЇХ ГІПЕРТЕРМІЇ

03.00.04. — Біохімія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Львів — 1993



НВ 27 994

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

Наукові керівники: доктор біологічних наук, професор КУСЕНЬ С. П., кандидат біологічних наук СТОЙКА Р. С.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, В. В. СНІТИНСЬКИЙ
доктор біологічних наук, професор М. М. ВЕЛИКИЙ.

Провідна установа — Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького АН України.

Захист відбудеться «14» вересня 1993 р. о «10⁰⁰» год на засіданні спеціалізованої вченої ради Д.020.14.01 при Інституті фізіології та біохімії тварин Української Академії Аграрних Наук за адресою: 290034, м. Львів—34, вул. В. Стуса, 38.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотечі Інституту фізіології та біохімії тварин УААН.

Автореферат розісланий «7» липня 1993 р.

ЛНБ України ім. В. Стефаніка



00815493 (U)

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук
ім. В. Стефаніка
АН України

Робак

В. Є. РОБАК

АКТУАЛЬНІСТЬ РОБОТИ.

Важливою властивістю живих організмів є їх здатність пристосовуватись до екстремальних умов навколишнього середовища. Тому широке зацікавлення викликають дослідження біохімічних змін, що відбуваються у клітинах тварин і людини під впливом стресових чинників, а також з'ясування молекулярних механізмів, які забезпечують виживання клітин та відновлення їх нормальних фізіологічних функцій після припинення такого впливу.

Встановлено, що іони важких металів, арсеніти, йодацетамід [Levinson et al., 1980], дефіцит глюкози [Pouyssegur et al., 1977], ультрафіолетове опромінювання [Williams et al., 1989], а також інші діючі агенти [Levinson et al., 1980, Lee et al., 1991], викликають у клітинах регуляторні ефекти, які за багатьма ознаками подібні до тих, що мають місце при дії гіпертермії [Welch, 1990]. У зв'язку з цим результати досліджень біохімічних змін, що виникають у клітинах під впливом теплового шоку, можуть бути використані при вивченні молекулярних механізмів дії різноманітних екстремальних умов на клітини.

До тепер залишаються недостатньо з'ясованими молекулярні механізми, що забезпечують функціонування різних регуляторних систем клітин під час дії гіпертермії та після її припинення. Проведення досліджень у цьому напрямку важливе для розробки рекомендацій по забезпеченню скерованого впливу на виживання клітин в умовах дії стресових чинників та повернення клітин до нормального фізіологічного стану. Перш за все необхідно порівняти протікання цих процесів у нормальних та пухлинних клітин, оскільки локальна гіпертермія пухлин пропонується як один із засобів лікування онкологічних хворих [Robins et al., 1984, Джаврид и др., 1987].

Оскільки багатьма дослідниками [Roberts & Sporn, 1985, Кусень, Стойка, 1985, Никольский и др., 1987, Massague, 1990] показано, що основними регуляторами багатьох клітинних функцій у нормі та при різних патологічних станах організму є поліпептидні фактори росту (ПФР), то доцільним є дослідити роль цих факторів росту у процесах відновлення функцій нормальних і пухлинних клітин у період після припинення дії гіпертермічного шоку. У першу чергу увагу тут привертає трансформуючий фактор росту β -типу

(TGF- β), який є одним з найбільш поширених факторів росту, а мРНК даного фактора росту та його рецептори виявляються практично в усіх досліджених нормальних та пухлинних клітинах [Derynck et al., 1985, 1987, Wakefield et al., 1987].

МЕТА ТА ЗАВДАННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ: Головною метою роботи було в'ясувати роль аутокринних механізмів у регуляції процесів біосинтезу ДНК та білків в період відновлення функцій нормальних і пухлинних клітин тварин і людини після гіпертермічної обробки.

Для досягнення цієї мети поставлені такі завдання:

1. Дослідити вплив теплового шоку на здатність клітин секретувати у культуральне середовище речовини, що регулюють синтез ДНК та синтез клітинних білків;

2. Вивчити вплив теплового шоку на електрофоретичні спектри новосинтезованих білків у нормальних та пухлинних клітинах тварин і людини;

3. Вивчити дію TGF- β на електрофоретичні спектри білків у клітинах різного походження;

4. Дослідити вплив теплового шоку, TGF- β та епідермального фактора росту (EGF) на активність секретованих клітинами серинових протеїназ;

5. Дослідити вплив теплового шоку, TGF- β та EGF на вміст мРНК протоонкогенів c-myc та c-fos у нормальних і пухлинних клітинах.

НАУКОВА НОВИЗНА РОБОТИ. Встановлено, що у пухлинних клітин в ході відновлення їх функцій після дії теплового шоку активується секреція факторів, які регулюють інтенсивність біосинтезу ДНК та білків. У нормальних клітинах, на відміну від пухлинних, секреція таких регуляторів суттєво не змінюється. Серед факторів, що продукуються пухлинними клітинами, активне місце займають такі, активність яких суттєво залежить від тимчасового заміщення в середовища, у якому перебувають ці фактори.

Проведене порівняльне дослідження впливу теплового шоку та окремих ІФР на активність секретованих клітинами серинових протеїназ. Встановлено, що гіпертермія, TGF- β та EGF викликають подібні за характером зміни у рівні активності плазмінолітичних протеїназ у кондиціонованих клітинами культуральних середовищах.

Найвищий рівень активності цих протеїнає виявляється у середовищі, кондиціонованому саркомними клітинами.

Результати порівняльного вивчення дії гіпертермії та ТФР- β і ЕФР на інтенсивність транскрипції мРНК протоонкогенів c-myc та c-fos у нормальних і пухлинних клітинах свідчать про те, що ці чинники у багатьох випадках індують подібні за характером зміни рівня мРНК згаданих протоонкогенів.

НАУКОВО-ПРАКТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ РОБОТИ. Результати роботи можуть бути використані при розробці рекомендацій для лікування онкологічних захворювань за допомогою локальної гіпертермії. Перспективним є поєднання гіпертермії деяких пухлин та зниження рівня рН у зоні їх локалізації.

Отримані результати дозволяють краще зрозуміти суть процесів, що відбуваються у клітинах тварин і людини при дії на них стресових чинників та у період відновлення нормальних клітинних функцій після припинення такої дії.

ОСНОВНІ ПОЛОЖЕННЯ, ЩО ВНОСЯТЬСЯ НА ЗАМІСТ:

1. Здатність пухлинних клітин продукувати фактори, що стимулюють синтез ДНК і регулюють синтез білків зростає після гіпертермії, тоді як нормальні клітини за таких умов продукують лише інгібітори цих процесів.

2. Активність секретованих клітинами речовин, що стимулюють синтез ДНК та регулюють синтез білків, суттєво залежить від тимчасового закислення середовища, у якому знаходяться ці речовини.

3. Дія на клітини теплового шоку, а також ТФР- β та ЕФР викликає зростання активності секретованих цими клітинами серинових протеїнає.

4. Тепловий шок індуює у клітинах зміни рівня мРНК протоонкогенів c-myc та c-fos, які подібні до змін, що їх викликають ТФР- β і (чи) ЕФР.

АПРОВАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ: Матеріали дисертації доповідалися та обговорювалися на VI Українському біохімічному з'їзді (Київ, 1992), конференції "Биология клетки в культуре" (Санкт-Петербург, 1992), конференції "Морфогенетически активные вещества" (Морфоген III, Пушино, 1992), конференції молодих учених та на засіданні Ученої Ради Відділення регуляторних систем клітини

Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна АН України (Львів, 1992).

За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано дві наукові статті та три тези доповідей.

СТРУКТУРА ТА ОБ'ЄМ РОБОТИ: Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури (4 розділи), матеріалів та методів досліджень (10 розділів), результатів досліджень (6 розділів), обговорення результатів, узагальнення, висновків та списку використаної літератури, що містить 237 джерел вітчизняних та зарубіжних авторів. Робота викладена на 150 сторінках друкованого тексту та ілюстрована 26 рисунками.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

В роботі використовували клітини ліній NIH-3T3 в нормальних ембріонів миші та HT-1080 з саркоми миші, отримані з колекції клітинних культур Інституту цитології РАН (Санкт-Петербург). Клітини ліній A-549 з аденокарциноми легень людини, CCL-64 з карциноми легень норки та PC-103 (клони 3 с6 та 384/5) з саркоми миші, індукованої підшкірною імплантацією поліхлорвінілової пластинки, отримані в Інституті канцерогенезу Онкологічного наукового центру РАМН (Москва) і люб'язно надані д.м.н. Ставровською А.А.

Всі клітини, за винятком клітин лінії PC-103, культивували в середовищі Ігла в модифікації Дувльбекко (DME, Flow labs., Велика Британія) з додаванням 10 % сироватки крові плодів великої рогатої худоби (Діалек, Мінськ). Для культивування клітин лінії PC-103 використовували мінімальне середовище Ігла (Flow labs.) з додаванням 10 % сироватки крові великої рогатої худоби (Московський м'ясокомбінат).

Кондиціоновані середовища (к-середовища) отримували за загальноприйнятою методикою [Lyons et al., 1988]. Загальна тривалість кондиціонування становила 48 год. В ході кондиціонування (за 24 год до його завершення) у відповідні культуральні флакони вносили фактори росту (ТФР- β , 5 нг/мл; ЕФР, 5 нг/мл або їх поєднання в тих же концентраціях). Одну порцію об'єму к-середовища використовували для тестування без попереднього тимчасового заміщення (рі 2, 1 год), а іншу - після нього.

Гіпертермічну обробку клітин (44°C , 30 хв) здійснювали у термостатованій водняній бані. Для цього клітини висівали у культуральні флакони (у випадку збирання к-середовища) або у чашки Петрі (Ашмбга, Чехословаччина) (у випадку проведення електрофоретичних досліджень). Клітини в одних флаконах (або чашках Петрі) відразу піддавали гіпертермії та інкубували після цього протягом 48 год, в інших - 24 год інкубували до початку шоку, а потім - 24 год після нього. Наступні варіанти дослідів включали інкубацію клітин протягом 30, 36, 42, 44, 45, 46 і 47 год до теплового шоку та відповідно 18, 12, 6, 4, 3, 2 і 1 год після нього.

Інтенсивність синтезу ДНК та білків у клітинах визначали за включенням відповідно ^3H -тимідину та ^3H -лейцину. Для цього клітини висівали в 24-лунокові еластикові планшети (Linbro, Flow labs., Великобританія). Через певний час культуральне середовище у планшетах замінювали на досліджуване к-середовище та інкубували у присутності відповідного міченого попередника. Після закінчення дослідів визначали включення радіоактивної мітки в нерозчинну у трихлороцтовій кислоті фракцію клітин, використовуючи сцинтиляційний лічильник Mark-III (Tracor, Нідерланди).

Вивчення чутливості до протеолізу ріст-регулюючих факторів у безсироваткових культуральних середовищах, кондиціонованих клітинами лінії A-549 аденокарциноми легень людини до та після гіпертермії, проводили з використанням трипсину. К-середовища інкубували в присутності трипсину (75 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Boeringer, Німеччина) протягом 1 год при 37°C в термостатованій водняній бані. Після завершення інкубації у пробу з метою блокування дальшої дії ферменту вносили соєвий інгібітор трипсину (300 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma, США). У паралельному досліді до середовища перед інкубацією додавали розчин трипсину, попередньо змішаний зі згаданим інгібітором. В контрольному варіанті інкубацію здійснювали без будь-яких попередніх обробок.

Електрофорез білків у присутності додецилсульфату натрію здійснювали за методом Лемлі [Lemli, 1970] в пластинках поліакриламідного гелю з градієнтом концентрації акриламіду від 7 до 17%. Новосинтезовані клітинні білки виявляли за допомогою ауторадіографії за включенням ними ^{35}S -метіоніну під час інкубації

клітин у його присутності протягом 2-х год (дія теплового шоку) і 4-х год (дія ПФР).

Активність серинових протеїназ у концентрованих в 20 разів за допомогою ультрафільтрації (Amicon, США) к-середовищах визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 405 нм за кількістю розщепленого синтетичного субстрату Z_d-ала-ала-фен-арг-параіті-роаніліду (Діагностикум, Москва). Отримані результати розраховували в нг-еквівалентах плазміну згідно калібрувального графіка.

Кількість білка в концентрованих к-середовищах визначали за методом Лоурі та співавторів [Lowry et al., 1951].

Визначення рівня мРНК протоонкогенів c-myc і c-fos здійснювали після отримання сумарної РНК клітин за методом, описаним Бірнбоймом [Birnbom, 1988]. РНК відділяли від ДНК вибірково осадженням у суміші LiCl:етанол. Отримані препарати РНК естатували формамідом, наносили на нейлонову підкладку і "пришивали" до неї за допомогою опромінювання ультрафіолетовим світлом. ДНК-проби c-myc і v-fos, мічені ³²P, отримували методом випадкового праймера, використовуючи набір фірми Amersham (Великобританія). Гібридизацію міченої ДНК з РНК, імобілізованою на нейлоновому фільтрі, здійснювали за загально прийнятим методом [Маніатис та ін., 1984]. Радіоавтографи сканували на лазерному денситометрі CS-9000 (Shimadzu, Японія).

Всі досліді повторювали не менше 2-4 разів з 3-4 паралельними експериментами у кожному варіанті. Результати обробляли статистично. Порівнювання двох мінливих величин проводили на основі t-критерію Стьюдента [Рокицкий, 1967]. Відмінності між величинами вважали достовірними лише у тих випадках, коли рівень значимості P даного твердження не перевищував 0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

1. ВПЛИВ ТРАНСФОРМУЮЧОГО ФАКТОРА РОСТУ В ТА ГІПЕРТЕРМІЇ НА ЕЛЕКТРОРЕТИВНІ СПЕКТРИ ВІДКІВ КЛІТИН РІЗНИХ ЛІНІЙ

Щоб перевірити, чи за використаних нами умов проведення гіпертермії у клітинах досліджуваних ліній дійсно відбуваються процеси, характерні для відповіді клітин на дію цього чинника,

ми провели електрофоретичне дослідження інтенсивності синтезу білків у клітинах, які зазнавали дії теплового шоку. Показано, що у клітинах лінії А-549 через 1-6 год після припинення гіпертермії відсутні суттєві зміни в електрофоретичному спектрі білків. Лише через 12 і 18 год можна відзначити зростання відносної кількості білкової фракції з молекулярною масою близько 76 кДа.

Значно більш вираженими є зміни в електрофоретичному спектрі новосинтезованих клітинних білків, що виявляються за допомогою їх мічення ^{35}S -метіоїном. У перші години після теплового шоку чітко видно майже повне припинення синтезу більшості клітинних білків (рис. 1). Через 2 год після припинення дії стресового чинника спостерігається посилений синтез білка з молекулярною масою 76 кДа, який виявляється до 12 год після припинення гіпертермії. Згідно до даних літератури, подібна молекулярна маса характерна для найбільш поширених білків теплового шоку (ВТШ), що виявляються у еукаріотичних організмів [Welch, 80]. У той же час електрофоретичний спектр інших новосинтезованих білків вже через 6 год відновлюється майже до того стану, що був у клітинах, які не зазнавали дії стресового чинника.

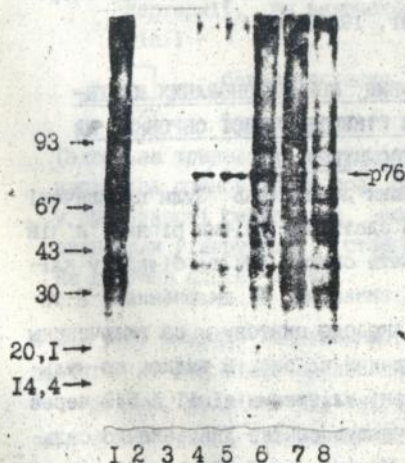


Рис. 1. Вплив теплового шоку на розподіл фракцій в електрофоретичних спектрах новосинтезованих білків клітин лінії А-549 аденокарциноми легень людини, отриманих після мічення цих білків ^{35}S -метіоїном
1 - білки клітин, що не подавалися дії гіпертермії
2 - 8 - білки клітин, відповідно через 1, 2, 3, 4, 6, 12 та 18 год після припинення дії гіпертермії
Стрілками вказано положення на електрофореграмі білків-маркерів з відомою молекулярною масою (у кДа).

Нами здійснено таке ж електрофоретичне дослідження білків клітин ліній PC-103 (клон 3 с6) та NIH-3T3 за умов гіпертермії. Встановлено, що у клітинах цих ліній після гіпертермії також відбувається різке зниження інтенсивності синтезу більшості клітинних білків і одночасне зростання синтезу окремих ВПШ. Отримані дані свідчать про те, що якісний склад цих білків залежить від типу досліджуваних клітин, хоча у клітинах усіх трьох використаних нами ліній спостерігається посилення синтезу саме білків з молекулярною масою близько 70 кДа.

У наступній серії дослідів нами здійснено електрофоретичне дослідження новосинтезованих білків у клітинах цих трьох згаданих вище ліній за умов дії на них ТФР- β . При цьому не виявлено змін розподілу білкових фракцій, індукованих ТФР- β . Лише у клітинах лінії HT-1080 фібросаркоми людини під впливом даного фактора росту спостерігається підвищення інтенсивності синтезу білків з молекулярною масою 70 та 73 кДа. Як уже відзначалося вище, подібна молекулярна маса характерна також і для білків, синтез яких індукується у клітинах під дією теплового шоку. Можна припустити, що білки, синтез яких індукується ТФР- β у клітинах лінії HT-1080, також належать до родини ВПШ. До речі, у 1992 році виявлено здатність ТФР- β індукувати синтез ВПШ у клітинах ембріонів курки [Takenaka and Nighower, 1992].

2. ВПЛИВ КУЛЬТУРАЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩ, КОНДИЦІОНОВАНИХ КЛІТИН НАМІ РІЗЬКИХ ЛІНІЙ ПІСЛЯ ЇХ ГІПЕРТЕРМІЧНОЇ ОБРОБКИ, НА ІНТЕНСИВНІСТЬ БІОСИНТЕЗУ ДНК

Цей і наступний розділи наших досліджень були присвячені вивченню впливу теплового шоку на здатність клітин рівних ліній секретувати речовини, які регулюють синтез ^{3}H - та білків у клітинах. Інтенсивність синтезу ДНК визначали з включенням ^{3}H -тимідину у ДНК, а інтенсивність білкового синтезу - за включенням ^{3}H -лейцину у білки. З даних, заведених на рис. 2 видно, що культуральні середовища, кондиціоновані клітинами лінії A-549 через 4-48 год після гіпертермії, стимулюють синтез ДНК значно сильніше, ніж контрольні середовища. Максимальний ефект (збільшення

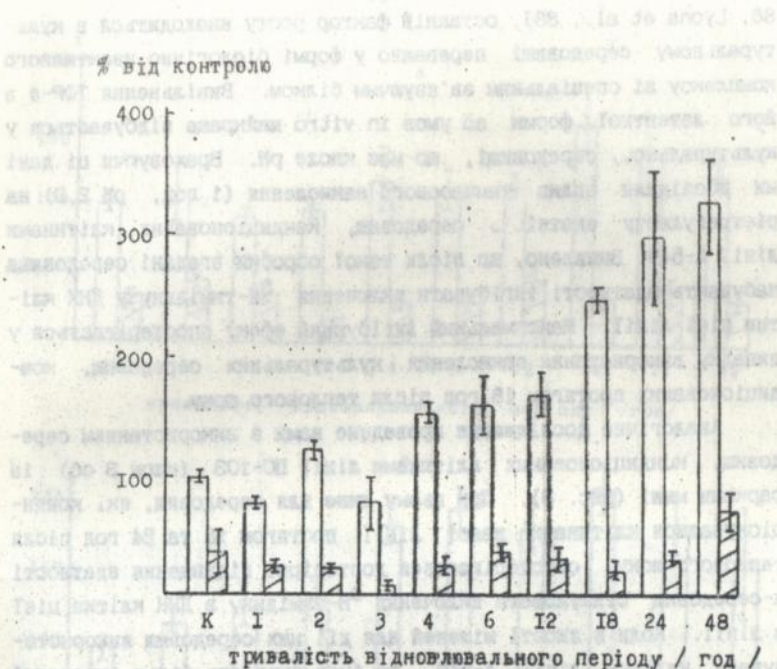


Рис. 2. Вплив культуральних середовищ, кондиціонованих клітинами лінії А-549 протягом різних проміжків часу після їх гіпертермії, на включення ^3H -тимідину в ДНК клітин цієї ж лінії

□ - без закислення

▨ - після тимчасового закислення

(Загальна тривалість кондиціонування в усіх дослідах та всіх варіантах становила 48 год. Включення ^3H -тимідину в ДНК клітин у присутності середовища, кондиціонованого клітинами, які не зазнавали гіпертермії, становило 8706 ± 275 імп/хв у розрахунку на клітини однієї лунки).

в 3,3 раз) виявило середовище, кондиціоноване цими клітинами протягом 48 год після припинення теплового шоку.

Відомо, що цілий ряд клітин можуть синтезувати і секретувати у позаклітинне середовище ІФР, у тому числі ТФР- β [DeLarco & Todaro, 1978, Roberts, 84]. За даними літератури [Pircher et al.,

86, Lyons et al., 88], останній фактор росту знаходиться в культуральному середовищі переважно у формі біологічно неактивного комплексу зі спеціальним зв'язуючим білком. Вивільнення ТФР- β з його латентної форми за умов *in vitro* найкраще відбувається у культуральному середовищі, що має кисле рН. Враховуючи ці дані ми дослідили вплив тимчасового закислення (1 год, рН 2,0) на рістрегулюючу здатність середовищ, кондиціонованих клітинами лінії А-549. Виявлено, що після такої обробки згадані середовища набувають здатності інгібувати включення ^3H -тимідину у ДНК клітин цієї лінії. Максимальний інгібуючий ефект спостерігається у випадку використання закислених культуральних середовищ, кондиціонованих протягом 18 год після теплового шоку.

Аналогічне дослідження проведене нами з використанням середовищ, кондиціонованих клітинами лінії РС-103 (клон 3 с6) із саркоми миші (рис. 3). При цьому лише для середовищ, які кондиціонувалися клітинами даної лінії протягом 18 та 24 год після теплового шоку, спостерігається достовірне підвищення здатності к-середовищ стимулювати включення ^3H -тимідину в ДНК клітин цієї ж лінії. Коли в якості мішеней для дії цих середовищ використовували клітини лінії А-549, то було виявлено більш виражений рістрегулюючий вплив. Так, істотне підвищення рістстимулюючої активності виявляється вже у середовищі, кондиціонованому протягом 4-х год після гіпертермії, а максимальне значення такої активності спостерігається через 18 год.

На рис. 3 видно, що під впливом тимчасового закислення к-середовища клітин лінії РС-103 (клон 3 с6) втрачають рістстимулюючу здатність і набувають рістінгібуючої здатності. Цей ефект має місце як при використанні в якості мішеней клітин лінії РС-103, так і клітин лінії А-549.

При дослідженні впливу гіпертермії на рістрегулюючу здатність культуральних середовищ, кондиціонованих псевдонормальними фібробластами лінії N1H-3T3 (рис. 4), ми не виявили такої, як для пухлинних клітин ліній А-19 та РС-103 (клон 3 с6), стимулюючої дії к-середовищ на інтенсивність синтезу ДНК. Вільше того, середовища, кондиціоновані нормальними клітинами у перші 4 год після гіпертермії, інгібують включення ^3H -тимідину в клітини ці-

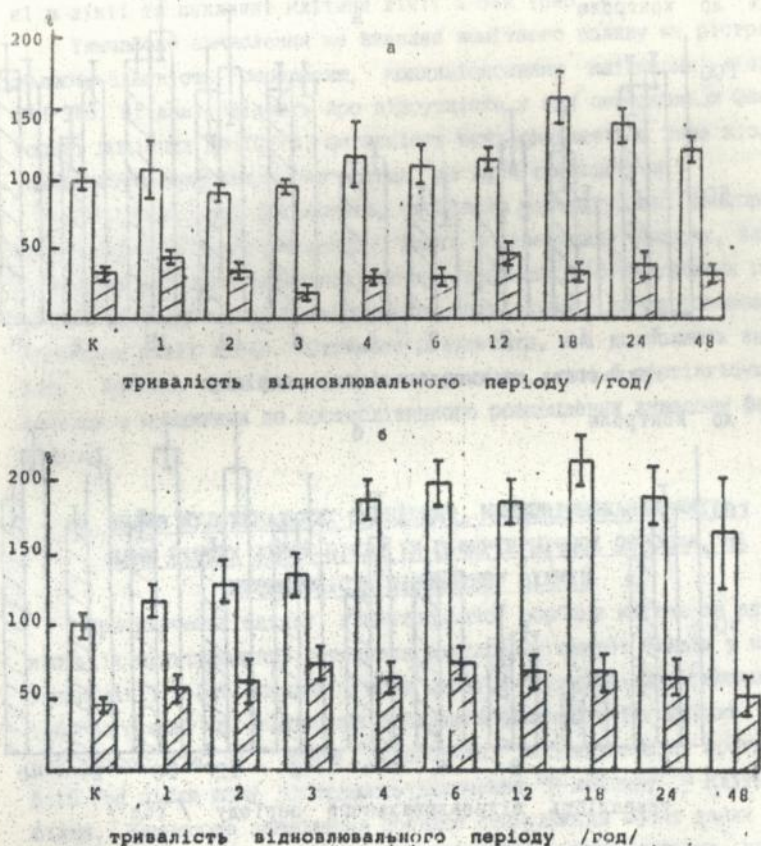


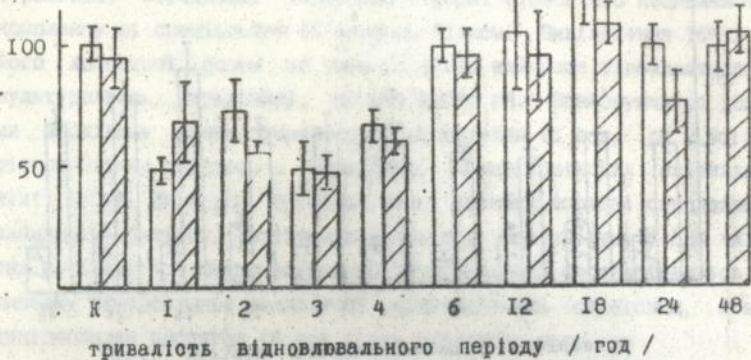
Рис. 3. Вплив культуральних середовищ, кондиціонованих клітинами лінії PC-103 (клон 3 с6) саркоми миші протягом різних проміжків часу після їх гіпертермії, на включення ³H-тимідину в ДНК клітин цієї ж лінії (а) та клітин лінії А-549 (б)

- - без закислення
- ▨ - після тимчасового закислення

(Загальна тривалість кондиціонування в усіх дослідах та всіх варіантах становила 48 год. Рівень включення мітки у ДНК клітин у присутності середовища, кондиціонованого клітинами, які не зазнавали гіпертермії, становив відповідно 3731±209 та 2042±129 імр/хв у розрахунку на клітини однієї лунки).

% до контролю

а



% до контролю

б

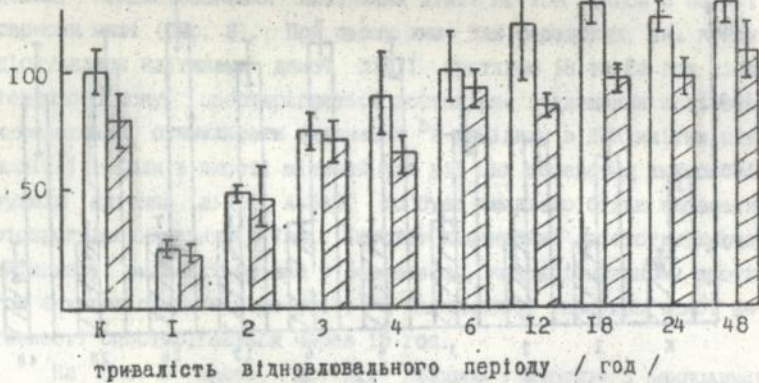


Рис. 4. Вплив культуральних середовищ, кондиціонованих мипиними ембріональними фібробластами лінії NIH-3T3 протягом різних проміжків часу після їх гіпертермії, на включення ³H-тимідину в ДНК клітин цієї ж лінії (а) та клітин лінії А-549 (б)



- без закислення



- після тимчасового закислення

(Загальна тривалість кондиціонування в усіх дослідах та всіх варіантах становила 48 год. Рівень включення мітки у ДНК клітин у присутності середовища, кондиціонованого клітинами, які не зазнавали гіпертермії, становив відповідно 16285±675 та 8123±591 імпл/кв у розрахунку на клітини однієї лунки).

еї ж лінії та пухлинні клітини лінії А-549 (рис. 4).

Тимчасове закислення не виявляє помітного впливу на рістрегулюючу здатність середовищ, кондиціонованих клітинами лінії НІН-ЭТЗ. Ці дані свідчать про відсутність у цих середовищах факторів, подібних до ТФР-β, активність яких виявляється лише після тимчасового закислення середовища, де вони знаходяться.

Для того, щоб встановити, чи дійсно рістрегулюючі фактори, що виявляються у к-середовищах, мають поліпептидну природу, нами проведено вивчення чутливості до дії трипсину рістрегулюючих речовин, що містяться у культуральних середовищах, кондиціонованих клітинами лінії А-549. Отримано результати, які дозволяють вважати, що не лише рістстимулюючі фактори, але й рістінгібуючі фактори є чутливими до протеолітичного розщеплення вказаним ферментом.

3. ВПЛИВ КУЛЬТУРАЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩ, КОНДИЦІОНОВАНИХ КЛІТИНАМИ РІЗНИХ ЛІНІЙ ПІСЛЯ ЇХ ГІПЕРТЕРМІЧНОЇ ОБРОБКИ, НА ІНТЕНСИВНІСТЬ БІОСИНТЕЗУ БІЛКІВ

При вивченні впливу гіпертермічної обробки клітин на здатність їх культуральних середовищ регулювати синтез білків у клітинах лінії А-549 показано, що у перші 4 години після припинення теплового шоку ці середовища виявляють здатність інгібувати даний процес (рис 5). Проте, середовища, кондиціоновані протягом 6-18 год після шоку стимулюють включення ³H-лейцину у клітинні білки. Тимчасове закислення посилює стимулюючий ефект даних середовищ. Необхідно відзначити, що ТФР-β, активна форма якого звільняється під час підкислення, всліді анаболічною дією [Takenaka & Nighower, 1992].

Аналогічне дослідження властивостей середовищ, кондиціонованих клітинами лінії РС-103, не виявляє помітного впливу цих середовищ на інтенсивність синтезу білків у клітинах ліній РС-103 та А-549 (рис. 6), а тимчасове закислення викликає помітне інгібування цього процесу. Ці дані свідчать про певні відмінності у протіканні біосинтетичних процесів у пухлинних клітинах епітеліального (лінія А-549) та мезенхімального (лінія РС-103) походження.

Дослідження впливу середовищ, кондиціонованих псевдонормальними клітинами лінії NIH-3T3, на рівень білоксинтетичної активності не виявляє помітного ефекту гіпертермії та тимчасового закислення (рис. 7).

Таким чином, нами встановлено, що гіпертермія підвищує здатність пухлинних клітин ліній A-549 та PC-103 секретувати у культуральне середовище речовини, що стимулюють біосинтез ДНК та регулюють синтез білків. Для псевдонормальних клітин такі властивості не характерні. Враховуючи характер впливу тимчасового

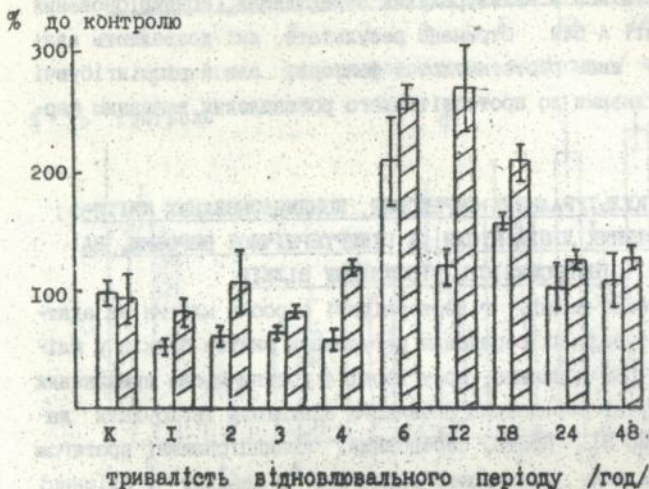


Рис. 5. Вплив культуральних середовищ, кондиціонованих клітинами лінії A-549 протягом рівних проміжків часу після їх гіпертермії, на включення ^3H -лейцину в білки клітин цієї ж лінії



- без закислення



- після тимчасового закислення

(Загальна тривалість кондиціонування в усіх дослідках та всіх варіантах становила 48 год. Включення ^3H -лейцину в білки клітин у присутності середовища, кондиціонованого клітинами, які не зазнавали гіпертермії, становило 3981 ± 108 імп за хв у розрахунку на клітини однієї лунки)

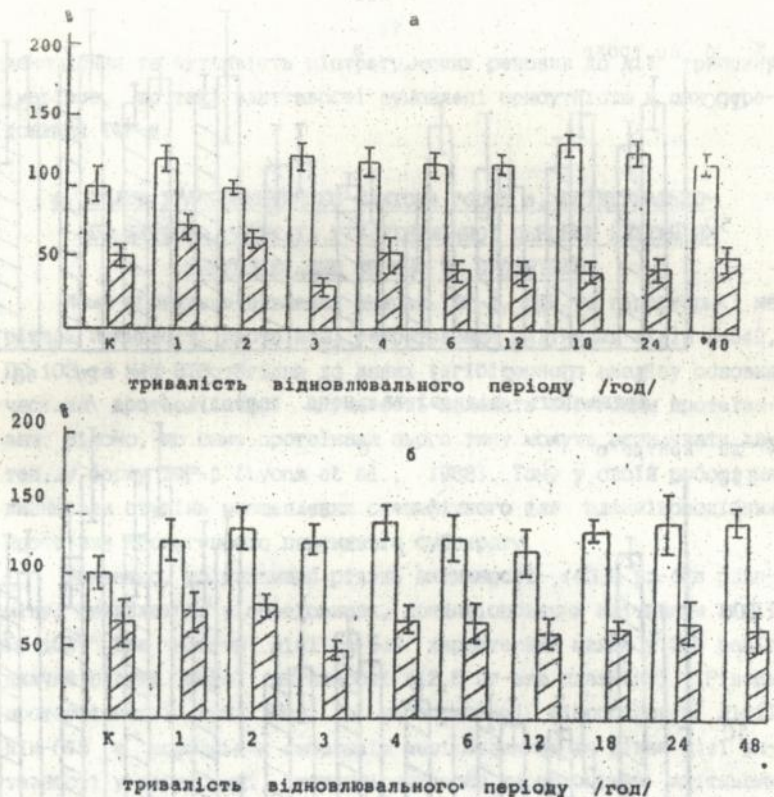


Рис. 6. Вплив культуральних середовищ, кондиціонованих клітинами лінії PC-103 (клон 3 с6) саркоми миші протягом різних проміжків часу після їх гіпертермії, на виключення ³H-лейцину в білки клітин цієї ж лінії (а) та клітин лінії A-549 (б)

- - без закислення
- ▨ - після тимчасового закислення

(Загальна тривалість кондиціонування в усіх дослідках та всіх варіантах становила 48 год. Рівень виключення мітки у білки клітин у присутності середовища, кондиціонованого клітинами, які не зазнавали гіпертермії, становив відповідно 2105±90 та 2210±130 імр/хв у розрахунку на клітини однієї лунки)

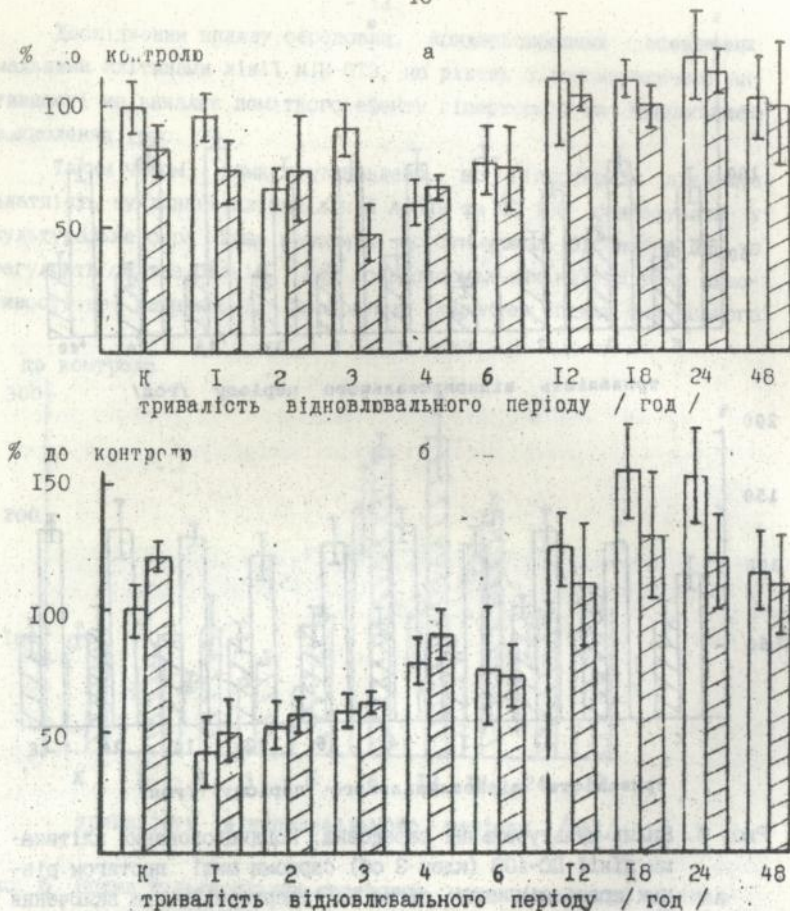


Рис. 7. Вплив культуральних середовищ, кондиціонованих мишиними ембрональними фібробластами лінії NIN-3T3 протягом різних проміжків часу після їх гіпертермії, на включення ^3H -лейцину в білки клітин цієї ж лінії (а) та клітин лінії A-549 (б)

- - без закислення
- ▨ - після тимчасового закислення

(Загальна тривалість кондиціонування в усіх дослідках та всіх варіантах становила 48 год. Рівень включення мітки у білки клітин у присутності середовища, кондиціонованого клітинами, які не аззнавали гіпертермії, становив відповідно 3014±247 та 844±80 імд/хв у розрахунку на клітини однієї лунки)

ИП

вакислення та чутливість рістрегулюючих речовин до дії трипсину імовірно, що такі властивості зумовлені присутністю в цих середовищах ТФР-в.

4. ВПЛИВ ТРАНСФОРМІУЮЧОГО ФАКТОРА РОСТУ В, ЕПІДЕРМАЛЬНО-ГО ФАКТОРА РОСТУ ТА ГІПЕРТЕРМІЧНОЇ ОБРОБКИ КЛІТИН НА СЕКРЕТЦІЮ ЛІНІЙ СЕРИЙ АХ ПРОТЕІНАЗ

Нами проведено вивчення впливу ТФР-в, ЕФР та гіпертермії на рівень активності протеїназ, секретованих клітинами ліній А-549, РС-103 та НІН-3Т3. Згідно до даних інгібіторного аналізу основна частина протеолітичної активності належить сериновим протеїназам. Відомо, що саме протеїнази цього типу можуть активувати латентну форму ТФР-в [Lyons et al., 1988]. Тому у своїй роботі ми визначали ступінь розщеплення специфічного для плазміноподібних протеїназ хромогенного пептидного субстрату.

Показано, що найвищий рівень активності (43,3 нг-екв плазміну) виявляється у середовищах, кондиціонованих клітинами лінії РС-103. Для клітин лінії А-549 характерний майже у 3,5 разів нижчий рівень такої активності (12,5 нг-екв плазміну). Рівень протеолітичної активності в к-середовищі фібробластів лінії НІН-3Т3 з нормальних ембріонів миші близький до рівня цієї активності у середовищі, кондиціонованому карциномними клітинами лінії А-549 і дорівнює 11,6 нг-екв плазміну в 1 мл середовища.

На рис. 8, а показано, що під дією ТФР-в і особливо ЕФР на карциномні клітини лінії А-549 спостерігається підвищення протеїназної активності в кондиціонованих середовищах. Поєднання впливу ЕФР і ТФР-в діє практично так само, як і за відсутності останнього. Гіпертермічна обробка клітин лінії А-549 індукує зростання протеїназної активності, причому, із продовженням тривалості часу після припинення дії теплового шоку ця зміна посилюється (рис. 8, г).

Протеолітична активність у середовищі, кондиціонованому саркомними клітинами лінії РС-103 (клон 3 об), підвищується майже у 2 рази після дії на клітини ТФР-в (рис. 8, б). ЕФР не впливає на цю активність і не змінює її підвищеного рівня, індукованого ТФР-в. Гіпертермічна обробка цих клітин не викликає досто-

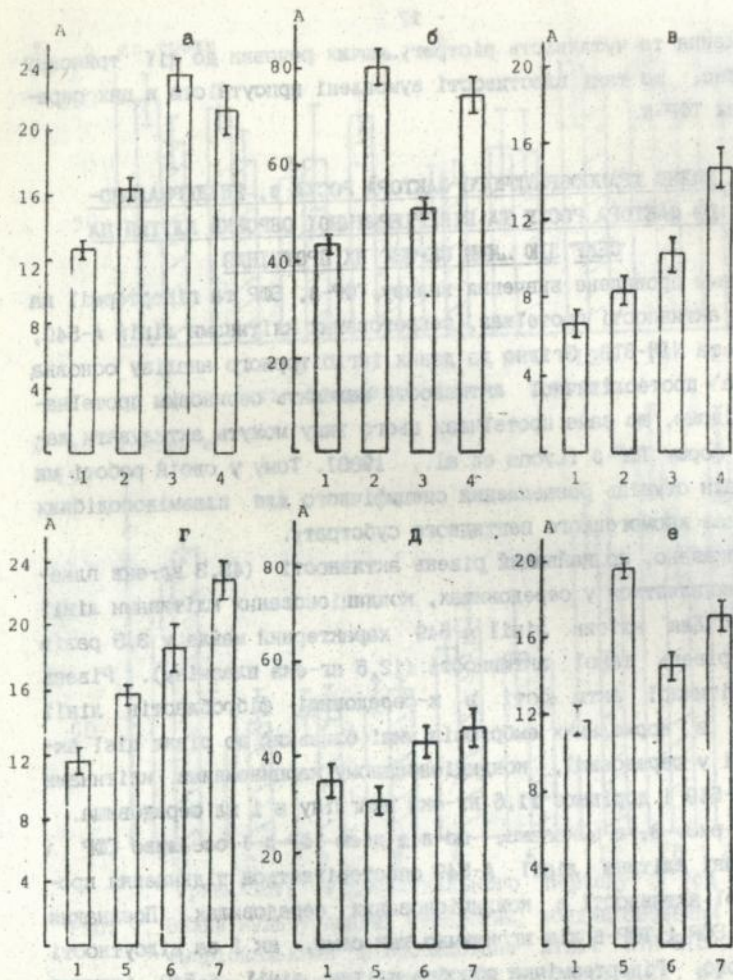


Рис. 8. Вплив ТФР- β , ЕФР, їх поєднання (а-в) і гіпертермічної обробки клітин (г-е) на активність плазміноподібних протеїназ у безсироватковому культуральному середовищі, кондиціонованому цими клітинами

а, г - клітини лінії А-549; б, д - клітини лінії PS-103;
в, е - клітини лінії NIH-3T3

(1 - контроль, 2 - ТФР- β (10 нг/мл), 3 - ЕФР (10 нг/мл), 4 - ТФР- β + ЕФР, 5 - через 2 год після теплового шоку, 6 - через 6 год після теплового шоку, 7 - через 18 год після теплового шоку) (по осі ординат: А - активність протеїназ, нг-еквіваленти плазміну в 1мл середовища)

вірних змін активності серинових протеїназ, секретованих ними (рис. 8, д).

Активність серинових протеїназ у культуральному середовищі, кондиціонованому псевдонормальними фібробластами лінії НІН-ЗТЗ, підвищується під впливом ЕТР і особливо при його поєднанні з ТФР-в (рис. 8, в). Гіпертермічна обробка клітин лінії НІН-ЗТЗ також індукує підвищення протеолітичної активності в кондиціонованих ними культуральних середовищах, причому максимальний рівень цієї активності спостерігається через 2 год після припинення дії теплового шоку (рис. 8, е).

Таким чином, нами виявлено, що ІКР та гіпертермія викликають подібні зміни в активності секретованих клітинами серинових протеїназ. Це дозволяє припустити, що описаний вище ауторегуляторний процес відіграє важливу роль у відновленні клітинних функцій після дії теплового шоку. Крім того, встановлено, що активність цих ферментів, секретованих саркомними клітинами, значно перевищує таку активність у випадку середовищ, кондиціонованих клітинами іншого походження.

5. ВПЛИВ ТРАНСФОРМУЮЧОГО ФАКТОРА РОСТУ В ЕПІДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТУ ТА ГІПЕРТЕРМІЧНОЇ ОБРОБКИ КЛІТИН НА ВМІСТ В НИХ МРНК ПРОТООНКОГЕНІВ c-myc та c-fos

Вплив на клітини різних стресових чинників викликає зміни їх проліферативної активності. При цьому серед швидких ефектів дії на клітини стресових чинників, зокрема теплового шоку, важливе місце займають зміни у рівні експресії певних генів. Відомо, що у відповідь на гіпертермію одночасно зі зниженням інтенсивності синтезу більшості клітинних білків відбувається різке підвищення рівня експресії генів ВТШ [Welch, 1990]. Бух та співавтори [Bukh et al. 1990] виявили зміну інтенсивності експресії деяких протоонкогенів, що відіграють важливу роль у визначенні проліферативної активності клітин.

На сьогодні загальновізнаним є твердження про те, що основними регуляторами проліферативної активності клітин є ПФР. Очевидно, що інтеграція багатьох регуляторних сигналів, які генеруються в окремих компартментах клітин від дією факторів росту,

відбувається у клітинному ядрі [Hunter, 1991, Morello et al., 1990].

Важливим елементом у регуляторній дії ТФР- β є індукована ним експресія генів, які кодують транскрипційні фактори (c-jun, jun B, c-fos, c-myc), ЦФР, рецептори факторів росту або інші біорегулятори, які, у свою чергу, можуть індукувати різноманітні ефекти у клітинному ядрі [Massague, 1990]. Є підстави вважати, що вплив ТФР- β на проліферацію та диференціацію клітин зумовлений саме каскадом вторинних ядерних ефектів, індукованих продуктами вказаних генів [Massague, 1990].

Нами проведено дослідження впливу ТФР- β , ЦФР та гіпертермії на рівень експресії мРНК протоонкогенів c-myc та c-fos у клітинах досліджуваних ліній. Показано, що динаміка викликає дією цих чинників зміна вмісту мРНК - продукту гена c-myc у карциномних клітинах лінії A-549 суттєво залежить від наявності сироватки крові у культуральному середовищі. Виявлено істотні відмінності у зміні вмісту мРНК згаданого протоонкогена між псевдонормальними фібробластами лінії NIH-3T3 та клітинами ліній PC-103 (клон 384/5) і A-549 після їх гіпертермічної з'робки. Проте, для всіх трьох ліній клітин динаміка зміни експресії гена c-myc у клітинах, що зазнали дії теплового шоку, залежності від їх типу нагадує таку динаміку у клітинах під дією окремих факторів росту або їх поєднання. Ці дані вказують на можливу роль експресії гена c-myc у процесах відновлення клітинних функцій після гіпертермії.

У подібних дослідженнях впливу ТФР- β і ЦФР та гіпертермії на вміст мРНК протоонкогена c-fos встановлено, що характер дії цих чинників суттєво залежить від типу клітин-мішеней. Проте, для кожної з досліджених клітинних ліній дія теплового шоку на інтенсивність експресії гена c-fos є подібною до дії одного із згаданих факторів росту, або їх поєднання.

УЗАГАЛЬНЕННЯ

Порівняння результатів проведених нами досліджень з наявними у літературі даними, що стосуються вивчення наслідків гіпертермічного впливу на клітини різних організмів, дозволяє зробити

ряд увагальнень. Ми вважаємо, що важливу роль у відновленні нормальної інтенсивності синтезу ДНК та білків відіграє здатність клітин секретувати біорегулятори росту. Про це свідчить наявність у κ -середовищах, отриманих від пу: тинних клітин ліній А-549 та ПС-103 (клон З.сб) через 6 і більше год після припинення гіпертермії речовин, що регулюють синтез ДНК та білків у цих клітинах. У той самий час культуральні середовища, кондиціоновані псевдонормальними фібробластами лінії N1H-3T3, не володіють здатністю стимулювати біосинтетичну активність у клітинах. Ці дані вказують на наявність відмінностей у прояві аутокринних функцій у нормальних та пухлинних клітинах, що піддавалися тепловому шоку.

Встановлено, що електрофоретичні спектри ВТШ, індукованих гіпертермією у клітинах досліджуваних нами ліній відрізняються між собою. Якщо синтез ВТШ з молекулярною масою близько 70 кДа індукується в усіх типах клітин, то ВТШ з молекулярною масою близько 85 кДа - у клітинах ліній ПС-103 та N1H-3T3, а ВТШ з молекулярною масою близько 100 кДа - у клітинах лінії N1H-3T3. У клітинах лінії NT-1080 з фібросаркоми людини під дією ТФР- β відбувається зростання синтезу білків з молекулярною масою 70 та 73 кДа, які за деякими властивостями подібні до ВТШ.

Порівняльне дослідження впливу гіпертермії з одного боку та ТФР- β і ЕФР з іншого боку, на активність секретованих клітинами серинових протеїназ свідчить про подібність змін у активності цих ферментів під впливом згаданих чинників. Максимальний рівень активності серинових протеїназ спостерігається у культуральних середовищах, кондиціонованих саркомними клітинами (лінія ПС-103 (клон З.сб)). Оскільки вважається, що деякі серинові протеїнази (плазмін, катепсин D) здатні активувати латентну форму ТФР- β , то не виключено, що таке підвищення протеолітичної активності у позаклітинному середовищі сприяє участі ТФР- β в аутокринній регуляції функцій цих клітин у період їх відновлення після дії гіпертермічного стресу. Виявлено також, що зміни у вмісті мРНК протоонкогенів *c-myc* та *c-fos*, які викликаються гіпертермією та ТФР- β і ЕФР є подібними.

Отже, здатність клітин до секреції ПФР, зокрема ТФР- β , і

функціонування у них регуляторних систем, які сприяють появі біологічно активної форми цього фактора росту (плазміноподібні протеїнази) та посередковують його дію (протоонкогени *c-myc* та *c-fos*), мож. ль відігравати важливу роль в аутокринній регуляції клітинних функцій у період їх відновлення після гіпертермії.

В И С Н О В К И

1. Гіпертермія підвищує здатність пухлинних клітин ліній A-549 та PC-103 секретувати у культуральне середовище речовини, що стимулюють біосинтез ДНК та регулюють синтез білків. Після тимчасового закислення кондиціоновані середовища, отримані від цих пухлинних клітин, втрачають таку активність і набувають здатності інгібувати біосинтез ДНК.

2. Гіпертермія індукує у псевдонормальних фібробластів лінії NIH-3T3 здатність секретувати інгібітори синтезу ДНК та білків. Через 6 і більше годин після припинення теплового шоку така активність у цих клітин не проявляється.

3. Фактори, що секретуються у культуральне середовище клітинами лінії A-549 аденокарциноми легенів людини і регулюють синтез ДНК, мають поліпептидну будову, оскільки вони є чутливими до дії трипсину.

4. Характер впливу тимчасового закислення на активність ріст-регулюючих факторів, секретованих у культуральне середовище пухлинними клітинами, які зазнали гіпертермії, вказує на наявність серед них трансформуючого фактора росту β -типу.

5. Трансформуючий фактор росту β та сироватка крові плодів великої рогатої худоби володіють здатністю інтенсифікувати синтез білків з молекулярною масою близько 70 і 73 кДа у клітинах лінії HT-1080 фібросаркоми людини. Діючи на клітини лінії A-549, проліферація яких інгібується трансформуючим фактором росту β , цей фактор суттєво не впливає на інтенсивність синтезу згаданих білків.

6. Рівень активності плазміноподібних протеїназ у середовищі, кондиціонованому саркомними клітинами (лінія PC-103), майже у 3,5 разів перевищує такий рівень у середовищі, кондиціонованому карциномними (лінія A-549) та псевдонормальними (лінія NIH-3T3)

клітинами. Гіпертермія, трансформуючий фактор росту β і епідермальний фактор росту викликають подібні зміни в активності плазмінородібних протеїназ, що секретуються різними типами клітин у безсироваткове культуральне середовище.

7. Гіпертермія, трансформуючий фактор росту β і епідермальний фактор росту індують тимчасове зростання вмісту мРНК протоонкогена *c-myc*, що вказує на можливу роль експресії гена *c-myc* у процесах відновлення клітинних функцій після гіпертермії.

8. Характер впливу трансформуючого фактора росту β і епідермального фактора росту та гіпертермії на вміст мРНК протоонкогена *c-fos* суттєво залежить від типу клітин-мішеней. Для кожної з досліджених клітинних ліній дія теплового шоку на інтенсивність експресії гена *c-fos* є подібною до дії одного із згаданих факторів росту, або їх поєднання.

9. Результати проведених нами досліджень свідчать про неоднаковий вплив гіпертермії на процеси росту нормальних і пухлинних клітин. Важливу роль у відновленні функцій пухлинних клітин може відігравати трансформуючий фактор росту β .

СПИСОК НАУКОВИХ РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Корчинський А.Г., Стойка Р.С., Кусень С.И. Тепловой шок модулирует способность клеток линии А-549 из аденокарциномы легкого человека аутокринно регулировать интенсивность биосинтеза ДНК и белков // Биохимия - 1992. - 57, - N 11. - С. 1612-1647.

2. Корчинський О.Г., Стойка Р.С., Гарасько С.Я., Шафранська Г.І. Аутокринна регуляція біосинтезу ДНК та білків в період відновлення клітинних функцій після дії теплового шоку // VI Укр. біохім. з'їзд: Тези допов. ч. I. - Київ, 1992. - С. 163.

3. Стойка Р.С., Сумельницький С.И., Корчинський А.Г. Изучение механизмов, определяющих направленность в регуляции пролиферации клеток трансформирующим фактором роста β // Рабочее совещание "Морфоген-3" /Пушино, 1992/, Онтогенез. - 1992. - 23, N 3. - С. 315-316.

4. Корчинський А.Г., Стойка Р.С. Особенности аутокринной функции нормальных и опухолевых клеток в период восстановления после теплового шока // Совещание "Биология клетки в культуре" /Санкт-

Петербург, 1992/, Цитология. - 1992. - 34, N 9. - С. 74.

5. Стойка Р.С., Корчинский А.Г., Кусень С.И. Влияние трансформирующего фактора роста β , эпидермального фактора роста и гипертермии на способность нормальных и опухолевых клеток изменять протеиназную активность кондиционированных ими культуральных сред // Эксперимент. онкология - 1993. - 15, N 3. - С. 20-25.

Підписано до друку 03.06.93 Формат 60x84/16 Друк офсет. Папір офсет. Умов друк.арк. 1,16 Умов фарбо-відб. 1,4 Обл.-вид.арк. 1,2. Тираж 100 прим. Зам. 2548.

Обласна книжков. друкарня, 290000, Львів, вул. Стефаника, 11

466207

AB 27.994

AB 27.994