

4510 •
К 703

УКРАЇНЬСЬКА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ І БІОХІМІЇ ТВАРИН

На правах рукопису

КОРЧИНСЬКА Олена Степанівна

**ТРАНСПОРТ КАЛЬЦІЮ В ОПОСЕРЕДКУВАННІ
ДІЇ ПОЛІПЕПТИДНИХ ФАКТОРІВ РОСТУ
НА НОРМАЛЬНІ ТА ПУХЛИННІ КЛІТИНИ**

03.00.04 - Біохімія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Львів - 1996

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі медичної біології та генетики Львівського державного медичного інституту та у Відділенні регуляторних систем клітини Інституту біохімії ім.О.В.Палладіна НАН України.

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор З.Д. ВОРОБЕЦЬ

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор О.Г. МАЛИК

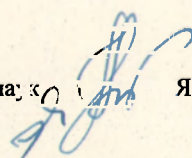
доктор біологічних наук, професор М.Ф. ТИМОЧКО

Провідна установа - Інститут біохімії ім.О.В.Палладіна НАН України

Захист відбудеться " 7 " Травня 1996 р. о "10" год на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 04.14.01 при Інституті фізіології і біохімії тварин Української академії аграрних наук за адресою: 290034, м. Львів-34, вул. В.Стуса, 38.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту фізіології і біохімії тварин УААН.

Автореферат розісланий " 5 " квітня 1996 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
доктор сільськогосподарських наук  Я.І. Кирилів

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

АКТУАЛЬНІСТЬ ПРОБЛЕМИ. З'ясування механізмів регуляції проліферації та диференціації клітин є важливою проблемою сучасної біології і теоретичної медицини. Дослідження останніх років вказують на те, що основну роль у цих процесах відіграють поліпептидні фактори росту – гормоноподібні речовини, які продукуються нормальними та пухлинними клітинами не лише *in vitro*, але й *in vivo* [Кусень, Стойка, 1985, Wakefield et al., 1987, Massague, 1990, Фильченков и др., 1994]. Особливе зацікавлення до вивчення біологічної дії цих біорегуляторів викликає той факт, що ряд патологічних станів організму супроводжується суттєвими змінами інтенсивності продукції поліпептидних факторів росту та чутливості клітин-мішеней до їх дії. Зокрема, пухлинні клітини характеризуються значно вищою у порівнянні з нормальними клітинами здатністю до продукції деяких поліпептидних факторів росту [Goustin et al., 1986, Waterfield, 1990, Rizzino, 1993]. Найбільш поширеним серед цих факторів росту є трансформуючий фактор росту α (структурно-функціональний аналог епідермального фактора росту) та трансформуючий фактор росту β . Під час спільної дії дані біорегулятори можуть не лише посилювати рівень трансформованості пухлинних клітин, але й індукувати прояв ознак трансформованого фенотипу у нормальних клітин тварин і людини [De Larco & Todaro, 1978, Roberts et al., 1984].

Незважаючи на інтенсивність досліджень, молекулярні механізми функціонування регуляторних систем клітини, що забезпечують реалізацію біологічних ефектів поліпептидних факторів росту, залишаються недостатньо з'ясованими. Значну увагу серед таких регуляторних систем привертає контроль рівня кальцію у клітинах. Установлено, що зміни концентрації катіонів кальцію у клітинах під впливом деяких поліпептидних факторів росту спостерігаються вже в перші хвилини дії цих біорегуляторів. Катіони кальцію беруть участь у регуляції не лише процесів метаболізму, але й генної експресії [Moog et al., 1985, Whitaker & Patel, 1990, Berrige, 1993]. Проте, існують роботи, в яких не надається суттєве значення змінам внутрішньоклітинної концентрації кальцію в реалізації деяких ефектів факторів росту на клітини [Cutry et al., 1989]. Тому важливо встановити, чим зумовлені такі результати.

Ураховуючи ці дані, ми вивчили особливості функціону-

вання кальцій-транспортуючих систем не лише у нормальних, але й у пухлинних клітинах, а також за різних умов культивування клітин тварин і людини. Вважаємо, що результати такого порівняльного аналізу дозволили нам більш аргументовано стверджувати про участь систем транспорту кальцію в опосередкуванні біологічної дії поліпептидних факторів росту.

МЕТА ТА ЗАВДАННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ. Метою роботи є з'ясування участі систем транспорту кальцію в опосередкуванні дії трансформуючого фактора росту β -типу та епідермального фактора росту на нормальні та пухлинні клітини за різних умов їх культивування.

Для досягнення поставленої мети розв'язували наступні завдання:

1. Дослідження впливу трансформуючого фактора росту β -типу (ТФР- β) та епідермального фактора росту (ЕФР) на інтенсивність пасивного транспорту катіонів кальцію в клітині за умов їх різної щільності в моношаровій культурі та різної забезпеченості факторами сироватки крові;
2. Дослідження дії ТФР- β та ЕФР на інтенсивність виходу катіонів кальцію з нормальних та пухлинних клітин за умов різної щільності їх в моношаровій культурі;
3. Вивчення участі систем пасивного транспорту катіонів кальцію в опосередкуванні впливу ТФР- β та ЕФР на скорочення колагенового гелю фібробластами;
4. З'ясування ролі систем транспорту кальцію в забезпеченні реалізації мітогенних стимулів досліджуваних поліпептидних факторів росту.

НАУКОВА НОВИЗНА РОБОТИ. Уперше показано, що скерованість впливу ТФР- β та ЕФР на процеси транспорту кальцію у клітинах-мішенях суттєво залежить від щільності розміщення клітин у моношаровій культурі та від рівня забезпеченості клітин факторами сироватки крові. Установлено, що ТФР- β стимулює процес виходу Ca^{2+} з пермеабілізованих сапоніном фібробластів, які культивуються за умов їх забезпеченості сироваткою крові, але не впливає на даний процес у цих клітинах під час їх культивування в безсироватковому середовищі. ЕФР та ТФР- β інгібують процес виходу Ca^{2+} з пермеабілізованих клітин аденокарциноми за умов високої щільності клітин в культурі, тоді як у розрідженій культурі цих пухлинних клітин ЕФР стимулює процес виходу Ca^{2+} , а ТФР- β не впливає на

його інтенсивність.

Уперше виявлено, що блокатори пасивного транспорту кальцію інгібують стимульоване дією ТФР- β скорочення колагенового гелю фібробластними клітинами. Показано, що основну роль в регуляторному впливові ТФР- β на клітини відіграє пасивний транспорт Ca^{2+} чутливий до дигідропіридинів.

НАУКОВО-ПРАКТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ РОБОТИ. Результати роботи можуть бути використані в медицині при розробці ранозагоюючих засобів, активним компонентом яких є поліпептидні фактори росту. Крім цього, отримані дані використовуються в курсі лекцій на кафедрі біохімії Львівського державного університету ім. Ів. Франка.

ОСНОВНІ ПОЛОЖЕННЯ, ЩО ВИНОСЯТЬСЯ НА ЗАХИСТ:

1. Вплив трансформуючого фактора росту β та епідермального фактора росту на процеси виходу катіонів кальцію з пермеабілізованих нормальних та пухлинних клітин суттєво залежить від щільності розміщення клітин в моношаровій культурі та рівня їх забезпеченості факторами сироватки крові.

2. Вираженість та скерованість впливу трансформуючого фактора росту β та епідермального фактора росту на функціонування систем транспорту катіонів кальцію суттєво різняться у нормальних та пухлинних клітинах за однакових чи різних умов їх культивування.

3. Пасивний Ca^{2+} транспорт, чутливий до дії дигідропіридинів, відіграє головну роль в опосередкуванні дії трансформуючого фактора росту β та індукції скорочення колагенового гелю фібробластними клітинами.

АПРОБАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ТА ПУБЛІКАЦІЇ. Матеріали дисертації доповідалися та обговорювалися на конференції "Біологія клітки в культурі" (Санкт-Петербург, Росія, 1992), міжнародній конференції "Львівські лазери в дерматології, курортології і біології" (Львів, 1992), міжнародній конференції "Навколишнє середовище і здоров'я" (Чернівці, 1993), урочистій конференції, присвяченій 45-річчю заснування Інституту фізіології і біохімії тварин УААН та 95-річчю від дня народження академіка УААН С.З.Гжицького (Львів, 1995), конгресі Європейської Організації біології розвитку (Тулуза, Франція, 1995).

За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 4 нау-

кові статті та 5 тез доповідей.

СТРУКТУРА ТА ОБ'ЄМ РОБОТИ. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури (3 розділи), матеріалів та методів досліджень, результатів досліджень та їх обговорення (4 розділи); висновків та списку використаної літератури, що містить 231 джерело, в тому числі 18 вітчизняних та 213 зарубіжних авторів. Робота викладена на 140 сторінках друкованого тексту та ілюстрована і таблицею і 26 малюнками.

**ДЕКЛАРАЦІЯ ОСОБИСТОГО ВНЕСКУ ДИСЕРТАНТА В РОЗРОБКУ
НАУКОВИХ РЕЗУЛЬТАТІВ**

Всі експериментальні дослідження за темою дисертації виконані автором особисто.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Клітини та їх культивування. У роботі використовували фібробласти ембріонів людини (первинна культура) та клітини лінії NIH-3T3 з нормальних ембріонів миші і NRK-49F з нормальної нирки щура, отримані з колекції клітинних культур Інституту цитології РАН (Санкт-Петербург, Росія). Клітини лінії A-549 з аденокарциноми легень людини та клітини лінії CCL-64 з епітелію легень норки отримали з колекції клітинних культур Інституту канцерогенезу Онкологічного наукового центру РАМН (Москва, Росія).

Всі клітини культивували в середовищі Ігла в модифікації Дульбекко (DME, "Flow Labs.", Великобританія) з додаванням 10 % сироватки крові плодів великої рогатої худоби ("Диалек", Мінськ, Білорусія).

Інтенсивність транспорту кальцію в клітини визначали за включенням ними $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Для цього клітини висівали у 24-лункові пластикові планшети ("Flow Labs.") в середовищі DME, що містило 10 % (за об'ємом) сироватки крові плодів великої рогатої худоби. Моношар двічі промивали (1 мл/лунку) безсироватковим середовищем DME, збідненим на кальцій. Клітини інкубували протягом 10 хв при 37°C в 0,5 мл такого ж середовища, після чого до середовища додавали досліджувані поліпептидні фактори росту (ПФР). ТФР- β був отриманий у відділі регуляції проліферації клітин Відділення регуляторних систем клітини Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України і за даними електрофорезу в поліакриламідному гелі в присут-

ності додецилсульфату-Na мав гомогенність понад 95% [Сушельницький и др., 1992]. ЕФР отримано від фірми "Serva", Німеччина. Транспорт кальцію в клітини ініціювали додаванням до інкубаційного середовища $^{45}\text{CaCl}_2$ (5 мкКі/лунку, 13 ТБк/моль). Процес надходження $^{45}\text{Ca}^{2+}$ у клітини припиняли видаленням середовища та 3-кратним промиванням клітинного моношару середовищем, що містило 140 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 0,5 мМ LaCl_3 , 1 мМ HEPES, pH 7.4. Клітини руйнували 1 М NH_4OH (0,5 мл/лунку) і підраховували радіоактивність за допомогою сцинтиляційного лічильника Mark III ("Tracor", Нідерланди).

Вихід кальцію з пермеабілізованих клітин визначали за появою $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в культуральному середовищі попередньо навантажених ним клітин [Missiaen et al., 1992]. Моношар навантажених $^{45}\text{Ca}^{2+}$ клітин в чашках Петрі промивали буферним розчином, який містив 120 мМ KCl, 5 мМ MgCl_2 , 5 мМ АТР, 1 мМ HEPES, pH 7,2. Пермеабілізацію клітин здійснювали за допомогою сапоніну ("Serva", Німеччина, 20 мкг/мл). Через кожні 2 хв збирали буферний розчин для підрахунку кількості вивільненого з клітини радіоактивного кальцію, а до клітин додавали свіжий розчин. Підрахунок радіоактивності здійснювали за допомогою сцинтиляційного лічильника Mark III ("Tracor", Нідерланди).

Скорочення колагенового гелю клітинами. Гель готували шляхом змішування 0,34 М розчину NaOH з концентрованим (10^x) середовищем DME у співвідношенні 1:2 та охолодженим до 4°C розчином колагену в 0,1 % CH_3COOH (1:4). До отриманої суміші додавали необхідну для нормального культурального середовища кількість глутаміну ("Serva", Німеччина) та бікарбонату натрію (Підприємство по виготовленню бактерійних препаратів, Москва, Росія). Для роботи використовували колагеновий гель із вмістом білку 1,5 мг/мл. Фібробласти усували з поверхні культурального посуду за допомогою суміші розчинів 0,025 % трипсину (1:250, "Serva", Німеччина) та версену (1:1). Клітини осаджували центрифугуванням (190 г, 5 хв) і ресуспендували в невеликому об'ємі культурального середовища (2 млн клітин/мл). Суспензію клітин змішували з попередньо підготованою сумішшю, яка містила колаген ($1,5 \cdot 10^5$ клітин/мл) і поміщали в пластикові чашки Петрі діаметром 40 мм (3 мл/чашку) ("Ленмедполімер", Санкт-Петербург, Росія). Клітини інкубували в CO_2 -термостаті (вміст CO_2 - 5%, відносна вологість 100%). Сироватку крові в кінцевій концентрації 1% або 3%,

а також досліджувані фактори росту та блокатори транспорту кальцію у відповідних варіантах досліду додавали до суспензії клітин перед змішуванням із розчином колагену. У роботі використовували наступні специфічні блокатори транспорту кальцію: верапаміл, нітрендипін, ніфедипін та дилтіазем ("Sigma", США).

Через 1-3 год після внесення суспензії клітин, в чашки додавали культуральне середовище (1,5 мл/чашку), яке містило сироватку крові, фактори росту та блокатори транспорту кальцію у відповідних концентраціях. Утворений згусток гелю обережно відділяли від стінок та дна чашки за допомогою тонкої скляної палички. Після цього чашки з клітинами знову поміщали в CO₂-інкубатор. Вимірювання величини скорочення гелю здійснювали через кожні 24 год протягом 5 діб. Для цього чашки поміщали на міліметровий папір та визначали розміри колагенового гелю. Ступінь скорочення подавали у вигляді коефіцієнту K, який дорівнював процентному відношенню зменшення площі гелю у відповідному варіанті досліду до вихідної площі гелю [Montesano & Orci, 1988]:

$$K = \frac{S_E - S_0}{S_0} \cdot 100 \%, \text{ де}$$

S₀ - вихідна площа колагенового гелю;

S_E - площа колагенового гелю в конкретному досліді.

Синтез ДНК у клітинах оцінювали за включенням ³H-тимідину в фракцію клітин, нерозчинну в трихлороцтовій кислоті. Для цього клітини висівали в 24-лункові пластикові планшети ("Flow Labs.", Великобританія). Через 12-14 год культуральне середовище у планшетах замінювали на свіже культуральне середовище, до якого додавали досліджувані ПФР та в останні 5 год інкубації ³H-тимідин (185 КБк/мл, 1,7 ПБк/моль). Після закінчення досліду визначали включення радіоактивної мітки в нерозчинну у трихлороцтовій кислоті фракцію клітин, використовуючи сцинтиляційний лічильник Rac-beta (LKB, Швеція).

Електрофорез білків у поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію здійснювали за методом Лемлі [Laemmli et al., 1970] в пластинках гелю з градієнтом концентрації поліакриламиду від 7% до 18%. Новосинтезовані клітинні білки виявляли ауторадіографічно за включенням ними ³⁵S-метіоніну під час інкубації клітин у його присутності

протягом 2 год.

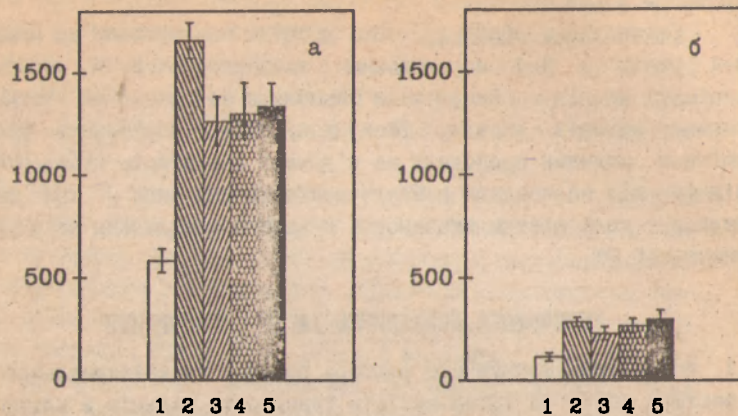
Статистична обробка. Всі досліди повторювали не менше 3-4 разів з 3-4 паралельними експериментами у кожному варіанті досліду. Результати обробляли за допомогою статистичних методів аналізу [Рокицкий, 1967]. Порівняння двох змінних величин проводили на підставі t-критерію Стьюдента. Відмінні між величинами 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 β та епідермального фактора росту на інтенсивність транспорту кальцію в клітині

Відомо, що під час культивування нормальних клітин *in vitro* після досягнення ними високої щільності в моношаровій культурі, відбувається зниження проліферативної активності клітин та сповільнення багатьох біосинтетичних процесів [Dulbecco, 1970]. Однією з головних особливостей пухлинних клітин є втрата ними здатності до "контактного гальмування" їх росту [Dulbecco, 1970. Roberts et al., 1984]. Ми дослідили вплив щільності розміщення клітин в моношаровій культурі на інтенсивність транспорту у них Ca^{2+} за умов дії на них ТФР- β та ЕФР. Показано, що інтенсивність транспорту Ca^{2+} у клітині лінії CCL-64 карциноми легень норки суттєво залежить від їх щільності в моношаровій культурі (мал. 1). Так, в клітинах зі щільністю 10^4 /лунку, вона в 5,2 разу вища ніж в клітинах зі щільністю 10^5 /лунку. ТФР- β (10 нг/мл) в обох випадках (розріджена і щільна культура) підвищує інтенсивність транспорту Ca^{2+} в клітині. У розріджені клітини надходить у 2,8 разу більше катіонів кальцію, а в щільні - в 2,5 разу більше, ніж у клітини, що не піддавалися дії ТФР- β . ЕФР (10 нг/мл) також викликає зростання інтенсивності транспорту Ca^{2+} в клітині досліджуваної лінії відповідно у 2,2 та 2,0 разу в порівнянні з контрольними клітинами. Збільшення рівня надходження Ca^{2+} в клітині має місце і під впливом суміші цих двох факторів росту - відповідно в 2,2 та 2,4 разу.

Раніше було виявлено здатність ряду мітогенів, в тому числі й ПФР, стимулювати процес надходження Ca^{2+} у клітини-мішені [Massague, 1990, Ullrich & Schlessinger, 1990]. Зокрема показано, що такий ефект здійснюють ТФР- β [Muldoon et



Мал. 1. Вплив ТФР- β , ЕФР та сироватки крові на інтенсивність входу $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в клітини лінії CCL-64 карциноми легень норки з різною щільністю моношару:

а) кількість клітин 10^4 /лунку

б) кількість клітин 10^5 /лунку

1 - контроль, 2 - ТФР- β (5 нг/мл), 3 - ЕФР (5 нг/мл),

4 - ТФР- β + ЕФР, 5 - 10 % сироватки крові.

По осі ординат - кількість включеного у клітини $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (імп/хв на 10^4 клітин)

al.,1988] та ЕФР [Масага,1986, Muldoon et al.,1988, Peppelenbosch et al.,1991]. Отримані нами результати узгоджуються зі згаданими даними літератури щодо здатності ПФР підвищувати інтенсивність надходження Ca^{2+} у клітини-мішені.

Отже, ТФР- β та його поєднання з ЕФР помітно підвищує інтенсивність транспорту $^{45}\text{Ca}^{2+}$ у клітини лінії CCL-64. Кінетичні характеристики цього процесу, індукованого поліпептидними факторами росту, суттєво залежать від щільності розміщення клітин в моношаровій культурі. З підвищенням щільності клітин відбувається зниження інтенсивності транспорту кальцію в клітини згаданої лінії.

2. Вплив трансформуючого фактора росту β та епідермального фактора росту на інтенсивність виходу кальцію з клітин

Відомо, що основний вклад у швидке зростання рівня кальцію в клітині, яке відбувається у відповідь на дію на клітини різних біорегуляторів, забезпечується не лише підви-

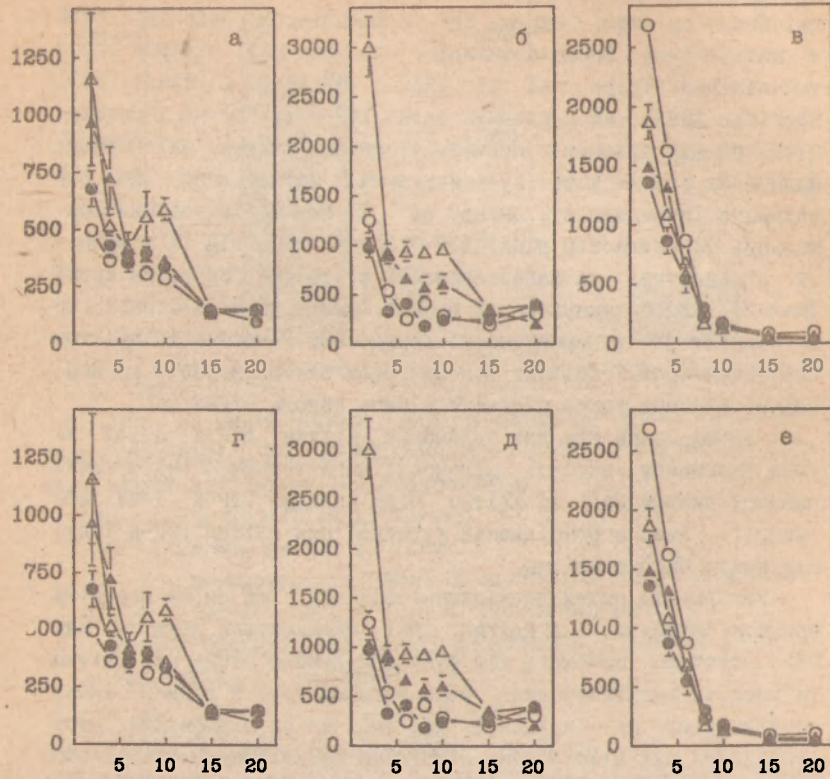
ценням інтенсивності транспорту Ca^{2+} з навколоклітинного середовища, але й стрімким вивільненням цього катіона з деяких клітинних органел, зокрема ЕПР та кальціосом, внаслідок змін у метаболізмі фосфоінозитидів плазматичних мембран клітин-мішеней [Volpe et al., 1988, Whitaker & Patel, 1990, Berridge, 1993]. Ми дослідили вплив ТФР- β та ЕФР на інтенсивність виходу кальцію з пермеабілізованих клітин, які вирощувалися за різних умов культивування. Установлено, що ЕФР підвищує інтенсивність викиду Ca^{2+} із пермеабілізованих нормальних фібробластів лінії NIH-3T3 незалежно від їх щільності в культурі та забезпеченості факторами сироватки крові (мал. 2). ТФР- β стимулює цей процес лише у таких клітинах, що культивуються у присутності середовища з достатнім вмістом сироватки крові. Спільна дія цих двох факторів росту на нормальні клітини також підвищує рівень виходу з них Ca^{2+} .

У той самий час для пухлинних клітин лінії A-549 за умов моношару високої щільності характерним є інгібування процесу виходу Ca^{2+} із клітин під впливом ТФР- β і/чи ЕФР (мал. 2). Лише в розрідженій культурі цих клітин ТФР- β індукує вихід Ca^{2+} з клітин.

Результати наших досліджень свідчать, що зміни перебігу процесу виходу Ca^{2+} з клітин, які викликаються дією на них ПФР, суттєво залежать від функціонального стану цих клітин та умов їх культивування. Вони узгоджуються з даними інших дослідників, які свідчать про те, що за відповідних умов тестування під дією різних мітогенів на клітини-мішені в останніх відбувається зростання внутрішньоклітинного рівня вільного кальцію [Berridge, 1993, Muldoon et al., 1988].

3. Вплив блокаторів пасивного транспорту кальцію на здатність трансформуючого фактора росту β стимулювати скорочення колагенового гелю фібробластами

Нормальне функціонування живих організмів суттєво залежить від здатності їх тканин і органів до репаративних процесів. Значну роль під час загоювання поверхневих ран відіграє стягування (контракція) країв рани фібробластами пошкодженої сполучної тканини. Зручною біологічною моделлю для вивчення цього процесу *in vitro* вважається скорочення колагенового гелю внесеними в нього фібробластами [Montesano & Orci, 1988, Nakagawa et al., 1989, Руднева и др., 1990]. Особ-



Мал. 2. Залежність впливу ТФР- β (10 нг/мл) та ЕФР (10 нг/мл) на інтенсивність виходу $^{45}\text{Ca}^{2+}$ із пермеабілізованих сапоніном клітин ліній (а-в) N1H-3T3 та (г-е) A-549 від умов культивування цих клітин:

а), г) клітини густиною $1 \cdot 10^4$ /лунку, які піддавали інкубації у безсироватковому середовищі протягом 48 год;

б), д) клітини густиною $1 \cdot 10^4$ /лунку, які не зазнавали інкубації у безсироватковому середовищі;

в), е) клітини густиною $1 \cdot 10^5$ /лунку, які не зазнавали інкубації у безсироватковому середовищі.

1 - о - контроль; 2 - ● - ТФР- β ; 3 - Δ - ЕФР;

4 - \blacktriangle - ТФР- β + ЕФР

По осі абсцис - час, хв.

По осі ординат - інтенсивність виходу $^{45}\text{Ca}^{2+}$ із клітин, імп/хв на лунку.

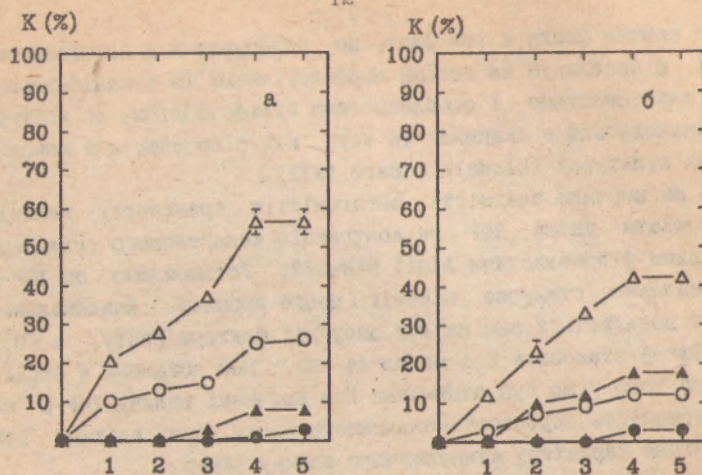
ливо вартим уваги є той факт, що, перебуваючи в колагеновому гелі, фібробласти за своїми морфологічними та функціональними властивостями і особливостями більше подібні до клітин, що знаходяться в тканинах *in vivo*, ніж фібробласти в моношарових культурах [Elsdale & Bard, 1972].

Ми вивчили здатність антагоністів транспорту кальцію модулювати вплив ПФР на контракцію колагенового гелю нормальними фібробластами лінії NIH-3T3. Установлено, що ТФР- β дозозалежно стимулює перебіг цього процесу. Максимальний ефект досягається вже на 4-у добу дії фактора росту, а ED_{50} дії ТФР- β становить 0,1 нг/мл (4 пМ). Цей показник є близьким до того, що був отриманий при вивченні впливу ТФР- β на інтенсивність субстрат-незалежного росту даних клітин. ЕФР не змінює характеру стимулюючого впливу ТФР- β .

З метою вивчення ролі транспорту катіонів кальцію у клітини в опосередкуванні стимулюючої дії ТФР- β на контракцію колагенового гелю фібробластами ми вивчили вплив деяких органічних та неорганічних блокаторів транспорту кальцію, зокрема двовалентних катіонів Co^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} та тривалентного La^{3+} . Показано, що катіони Cd^{2+} та La^{3+} в концентрації 10^{-5} М суттєво знижують рівень контракції, що викликана дією 1 % сироватки (мал.3). Крім того, виявлено, що всі використані неорганічні блокатори пригнічували дію ТФР- β по стимуляції контракції колагенового гелю.

Подібний ефект виявлений також і під час дії специфічних блокаторів дигідропіридинчутливих кальцієвих каналів: верапамілу (10^{-5} М), дилтіазему (10^{-7} М), нітрендипіну (10^{-7} М) та ніфедипіну (10^{-7} М), причому найбільш ефективним блокатором тут виявився ніфедипін (мал.3).

Відомо, що культивування клітин, в першу чергу тих, які отримані з нормальних тканин за умов дефіциту сироватки крові, веде до значного сповільнення темпів їх проліферації та зниження в них інтенсивності біосинтетичних процесів [Barnes et al., 1980, Chambard et al., 1983, Сушельницький та ін., 1990]. Тому ми дослідили вплив попередньої інкубації клітин у колагеновому гелі протягом 24 год за умов безсироваткового середовища з наступною їх стимуляцією ТФР- β (10 нг/мл) або сироваткою крові в кінцевій концентрації 3 %, на рівень перебігу контракції колагенового гелю нормальними фібробластами лінії NIH-3T3. Показано, що така обробка клітин веде до продовження лаг-періоду, який передуює скороченню



Мал. 3. Вплив блокаторів транспорту Ca^{2+} а) кадмію (10^{-5} М) та б) ніфедипіну (10^{-7} М) на інтенсивність стимульованого ТФР- β у присутності 1% сироватки крові скорочення колагенового гелю фібробластами лінії НІН-3Т3:

- 1 - ° - контроль;
- 2 - * - блокатори транспорту Ca^{2+} ;
- 3 - Δ - ТФР- β , 10 нг/мл;
- 4 - \blacktriangle - ТФР- β , 10 нг/мл + блокатори транспорту Ca^{2+} .

По осі абсцис - тривалість експерименту в добах;
по осі ординат - коефіцієнт контракції К (%).

площі колагенового гелю. Використані нами блокатори транспорту Ca^{2+} в досліджах без попередньої інкубації клітин за умов дефіциту сироватки також знижували рівень стимульованої 3% сироваткою крові та ТФР- β контракції колагенового гелю.

Молекулярні механізми, якими забезпечується скорочення колагенового гелю внесеними в нього нормальними фібробластами, залишаються нез'ясованими. Цікаво, що у клітинах, внесених в колагеновий гель, спостерігається зниження інтенсивності синтезу ДНК [Nakagawa et al., 1989]. Таким чином припускається, що стимуляція процесу контракції сироваткою крові та факторами росту відбувається не за рахунок збільшення кількості клітин.

Отримані нами дані дозволяють вважати, що значна роль в

забезпеченні стимулюючої дії ТФР- β на скорочення колагенового гелю фібробластами належить пасивному транспорту катіонів кальцію, чутливого до дигідропіридинів.

4. Вплив блокаторів транспорту кальцію на дію трансформуючого фактора росту β та епідермального фактора росту по регуляції інтенсивності синтезу ДНК у клітинах

Існують дані про те, що ТФР- β здатний стимулювати субстратзалежну проліферацію клітин лінії NRK-49F з нормальної нирки щура і практично не впливає на проліферацію псевдонормальних фібробластів лінії NIH-3T3 з ембріонів миші [Стойка і др., 1990]. Ми дослідили вплив ПФР на інтенсивність синтезу ДНК у клітинах згаданих ліній за умов їх культивування: 1) при відсутності сироватки крові у середовищі; 2) у розрідженій моношаровій культурі (10^4 клітин/ лунку) в присутності 10% сироватки крові; та 3) у щільній моношаровій культурі (10^5 клітин/лунку).

Використання перерахованих вище антагоністів транспорту Ca^{2+} у тих самих концентраціях що й під час дослідження процесу контракції колагенового гелю, виявило подібні тенденції у поведінці клітин. Цей результат може свідчити про те, що функціонування систем транспорту кальцію відіграє важливу роль під час відповіді клітин на дію поліпептидних факторів росту. Установлено, що клітини, які характеризуються зниженою чутливістю до дії мітогенів (щільна культура), володіють також і нижчою чутливістю до інгібуючого впливу антагоністів транспорту Ca^{2+} на їх проліферативну активність.

Раніше показано, що ряд клітин містить на своїй поверхні потенціал-чутливі кальцієві канали [Chen et al., 1986, Poppelbosch et al., 1991]. Це свідчить на користь припущення про важливу роль дигідропіридин-чутливих Ca^{2+} каналів в опосередкованні рiстрегулюючого впливу ТФР- β та ЕФР на клітини ліній NRK-49F та NIH-3T3. Отримані нами результати узгоджуються з даними інших авторів [Montero et al., 1995], які показали, що блокатори кальцієвих каналів при дії їх на клітини у концентраціях, близьких до використаних нами, здатні пригнічувати прояв регуляторних ефектів деяких мітогенів. Очевидно, що відмінності в результатах, отриманих нами та деякими іншими дослідниками [Muldoon et al., 1988], зумовлені особливостями функціонування кальцієвих каналів у використа-

них клітинах-мішенях та умовами проведення дослідів.

Порівняння впливу кальцієвих антагоністів на скорочення колагенового гелю та на інтенсивність синтезу ДНК у фібробластах лінії N1H-3T3 не дозволяє стверджувати про існування прямої корелятивної залежності між цими процесами. Отже, незважаючи на те, що блокатори транспорту кальцію в деяких клітинних тест-систем можуть інгібувати обидва згадані процеси, нема підстав рахувати, що вплив згаданих блокаторів опосередковується пригніченням проліферативної активності клітин. Очевидно, основну роль тут все-таки відіграє вплив цих блокаторів на механічну активність фібробластів (рухливість, скоротливість і т.п.), зумовлену активністю Ca^{2+} транспортних систем.

5. Вплив блокаторів транспорту кальцію на електрофоретичні спектри клітинних білків

Оскільки Ca^{2+} може відігравати роль вторинного посередника в регуляції багатьох клітинних функцій [Костюк, 1986, Whitaker, 1990, Berridge, 1993, Авдонин, Ткачук, 1994, Nicotega et al., 1994], важливим для клітини повинен бути контроль з їх боку за внутрішньоклітинним рівнем даного катіону. Порушення гомеостазу Ca^{2+} в клітинах веде до значних негативних наслідків [Авдонин, Ткачук, 1994]. Зокрема відомо, що катіони важких металів, до яких належать і використані нами неорганічні блокатори транспорту Ca^{2+} , арсеніти, кальцієві іонофори, а також інші сильно діючі речовини, можуть викликати в клітинах біологічні ефекти, характерні для дії на ці клітини різноманітних стресових чинників, таких як висока і низька температура, відсутність O_2 , глюкози тощо [Levinson et al., 1980, Welch, 1990]. Зручною експериментальною моделлю для вивчення наслідків впливу на клітини стресових чинників є гіпертермічна обробка клітин [Welch, 1990].

Щоб перевірити, чи дія на клітини кальцієвих блокаторів не зумовлена їх впливом, подібним до впливу різних стресових чинників, ми порівняли електрофоретичні спектри новосинтезованих білків у клітинах, які зазнавали дії деяких кальцієвих антагоністів та теплового шоку. Показано, що через 2 год після додавання у культуральне середовище блокаторів транспорту Ca^{2+} : верапамілу і катіонів Cd^{2+} та La^{3+} у вживаних нами концентраціях, не спостерігається змін в електрофоре-

тичному спектрі білків клітин лінії NIH-3T3, та у спектрі новосинтезованих клітинних білків, що виявлялися за допомогою їх мічення ^{35}S -метіоїном. У той самий час у перші години після теплового шоку спостерігаються характерні для дії стресових чинників зміни інтенсивності синтезу білків.

Відомо, що вплив іонів ряду важких металів, зокрема, використаних нами, може приводити до зупинки проліферації клітин [Welch, 1990]. Тому виявлений нами ефект кальцієвих антагоністів на інтенсивність контракції клітинами колагенового гелю та біосинтезу в них ДНК міг би бути поясненим не тільки прямою інгібуючою дією на функціонування Ca^{2+} -каналів. Проте, нами та іншими авторами [Montero et al., 1995] показано, що за використаних нами концентрацій згаданих блокаторів транспорту Ca^{2+} помітний вплив спостерігається в першу чергу лише на клітини, які перебувають у функціональному стані, що характеризується підвищеною чутливістю клітин до дії мітогенів.

Ці дані є ще одним доказом на користь того, що виявлені нами біологічні ефекти впливу на клітини блокаторів транспорту Ca^{2+} зумовлені їх специфічною дією, а не їх загальним стресовим впливом на клітини-мішені.

УЗАГАЛЬНЕННЯ

Аналіз даних літератури та результатів проведених нами досліджень дозволяє зробити ряд узагальнень. Ми вважаємо, що кальцій-транспортуючі системи мають важливе значення в реалізації ефектів поліпептидних факторів росту на клітини-мішені. Показано, що характер впливу ТФР- β і ЕФР на процес надходження Ca^{2+} у клітини та його виходу з пермеабілізованих клітин суттєво залежить від умов їх культивування. Спрямування регуляторного впливу ТФР- β на ці процеси відрізняється у нормальних і пухлинних клітин.

За допомогою використання блокаторів транспорту Ca^{2+} встановлено, що цей процес є важливою ланкою в здійсненні стимулюючої дії ТФР- β на процес скорочення колагенового гелю фібробластами миші та первинними ембріональними фібробластами людини. Інгібуючий вплив антагоністів транспорту Ca^{2+} забезпечується завдяки їх впливу на механічну активність клітин, а не за рахунок пригнічення проліферації клітин та за-

гального стрес-індукуючого впливу. Блокуючий вплив антагоністів транспорту Ca^{2+} на проліферацію клітин найбільш помітний за їх дії на клітини, які культивуються за умов, що є найбільш сприятливими для здійснення мітогенної дії досліджуваних факторів росту.

ВИСНОВКИ

1. Дія трансформуючого фактора росту β -типу, епідермального фактора росту та їх поєднання викликає зростання інтенсивності транспорту Ca^{2+} у карциномні клітини лінії CCL-64 легень норки.

2. Підвищення щільності розміщення клітин лінії CCL-64 в моношаровій культурі викликає зниження інтенсивності транспорту кальцію в клітини і змінює кінетичні характеристики цього процесу за умов його індукції трансформуючим фактором росту β та епідермальним фактором росту.

3. Епідермальний фактор росту та поєднання його дії з трансформуючим фактором росту β викликають зростання інтенсивності виходу Ca^{2+} з пермеабілізованих нормальних мишиних фібробластів лінії NIN-3T3 за умов щільної та розрідженої культур, дефіциту і нормальної забезпеченості клітин сироваткою крові. Трансформуючий фактор росту β -типу стимулює цей процес лише під час його дії на клітини, які ростуть у присутності сироватки крові в культуральному середовищі.

4. Епідермальний фактор росту стимулює процес виходу Ca^{2+} з пермеабілізованих клітин аденокарциноми легень людини лінії A-549 лише за умов низької щільності їх моношару в культурі та під час їх вирощування в безсироватковому культуральному середовищі. За таких умов трансформуючий фактор росту β -типу не впливає на вихід Ca^{2+} з цих пухлинних клітин.

5. Трансформуючий фактор росту β -типу, епідермальний фактор росту та поєднання їх дії викликають зниження інтенсивності виходу Ca^{2+} із карциномних клітин лінії A-549, що перебували в моношаровій культурі з високою щільністю клітин.

6. Клітини, що перебувають у функціональному стані, який характеризується зниженою чутливістю до дії мітогенів (висока щільність клітин в культурі), володіють також і зни-

женою чутливістю до інгібуючого впливу антагоністів транспорту Ca^{2+} на інтенсивність синтезу ДНК в цих клітинах.

7. Пасивний транспорт катіонів кальцію в клітинній мішені відіграє важливу роль в забезпеченні стимулюючої дії трансформуючого фактора росту β -типу на скорочення колагенового гелю фібробластами. Аналіз результатів дії на цей процес кальцієвих антагоністів свідчить про те, що такий вплив у першу чергу забезпечується функціонуванням дигідропіридин-чутливих кальцієвих каналів.

8. Інгібуюча дія блокаторів транспорту кальцію на скорочення колагенового гелю фібробластами лінії NIH-3T3 забезпечується головним чином через вплив цих блокаторів на механічну скоротливість клітин, а не зумовлена їх стресовим впливом на клітини чи впливом на проліферативну активність клітин.

9. Системи транспорту кальцію, зокрема, дигідропіридин-чутливі Ca^{2+} -канали, можуть опосередковувати біологічні ефекти, які викликаються поліпептидними факторами росту. Характер функціонування цих систем під час дії факторів росту суттєво залежить від щільності розміщення клітин-мішеней в культурі та рівня їх забезпечення факторами сироватки крові. Функціонування цих систем також суттєво відрізняється у нормальних і пухлинних клітин ссавців.

Список робіт, опублікованих за темою дисертації

1. Корчинська О.С., Воробець З.Д., Корчинський О.Г., Стойка А.М. Характер впливу трансформуючого фактора β -типу та епідермального фактору росту на транспорт кальцію у карциномні клітини лінії SCL-64 залежить від їх щільності в культурі // Доповіді АН України - 1993. - № 5, серія В - С. 141-144.
2. Корчинська О.С., Воробець З.Д. Роль дигідропіридин-чутливого транспорту кальцію в опосередкуванні впливу трансформуючого фактору росту β на контракцію колагенових гелів фібробластами миші лінії N1H-3T3 // Доповіді НАН України - 1995, № 5, серія В - С. 109-112.
3. Воробець З., Корчинська О., Пенцак Р. Вплив блокаторів транспорту кальцію на здійснювану поліпептидними факторами росту регуляцію інтенсивності синтезу ДНК у клітинах нирок щура лінії NRK-49F // Acta medica Leopoldia. - 1995, № 2., С. 9-15.
4. Корчинський О.Г., Корчинська О.С., Воробець З.Д., Стойка Р.С. Роль пасивного транспорту кальцію в стимульованому трансформуючим фактором росту β скороченні колагенового гелю фібробластами // Актуальні проблеми медицини, біології, ветеринарії і сільського господарства. - Львів, 1995. - С. 7-12.
5. Корчинская Е.С., Воробец З.Д., Кусень С.И. Влияние трансформирующего фактора роста β на пассивный транспорт кальция в клетках линии SCL-64 из карциномы легких норки // Собрание "Биология клетки в культуре" тез. докл. (Санкт-Петербург, 1992). - Цитология - 1992. - т. 34, № 9 - С. 73.
6. Корчинська О.С., Воробець З.Д. Залежність транспорту кальцію в клітині SCL-64 карциноми легень від густини їх в моношарі // Міжнародна конференція "Львівські лазери в дерматології, курортології і біології" (м. Львів, 1992). - Львів, 1992 - С. 143.
7. Воробець З.Д., Корчинська О.С., Корчинський О.Г. Вплив гіпертермії на біосинтез білків клітин різних ліній // Міжнародна конференція "Навколишнє середовище і здоров'я" (м. Чернівці, 1993). - Чернівці, 1993. - С. 14.
8. Korchinska L.S., Korchinskii A.G., Vorobets Z.D., Stoika R.S. Calcium blockers arrest the polypeptide growth

factors-induced collagen gel contraction by mouse embryo fibroblasts // Abstracts of Congress EDBC - Toulouse, 1995, P. 123.

9. Корчинський О.Г., Корчинська О.С., Воробець З.Д., Стойка Р.С. Роль транспорту кальцію в дії поліпептидних факторів росту на скоротливість колагенового гелю фібробластами тварин // Урочиста конф. присвячена 35-річчю від дня заснування Інституту фізіології і біохімії тварин і 95-річчю від дня народження засновника Інституту академіка УАСГН С.З.Гжицького Львів, 1995, С. 77-78.

Korchinska L.S.

Calcium transport in the action of polypeptide growth factors on the normal and tumour cells (manuscript)

Doctoral thesis on specialization 03.00.04 - Biochemistry.

L'viv State Medical Institute.

L'viv, 1996

The role of calcium-transporting systems in the realization of polypeptide growth factors effects on the target cells is learnt in this work. Pattern of transforming growth factor β (TGF- β) and epidermal growth factor on the Ca^{2+} influx and extrusion from the permeabilized cells was shown to be significantly dependent of cellular origin and cell culture conditions. Ca^{2+} transport was found to play an important role in the stimulatory effect of TGF- β on the collagen gel contraction by fibroblasts. Blocking effect of Ca^{2+} antagonists on the cellular proliferation was most significant for cells under conditions most favorable for realization of mitogenic action of investigated growth factors.

Корчинская Е. С.

Транспорт кальция в действии полипептидных факторов
роста на нормальные и опухолевые клетки (рукопись)

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 - биохимия, Львовский государственный медицинский институт, Львов, 1996.

В работе изучена роль кальций-транспортирующих систем в реализации эффектов полипептидных факторов роста на клетки-мишени. Показано, что характер влияния трансформирующего фактора роста β (ТФР- β) и эпидермального фактора роста на процесс поступления Ca^{2+} в клетки и его выброса из пермеабилizированных клеток существенно зависит от происхождения этих клеток и условий их культивирования. С помощью использования блокаторов транспорта Ca^{2+} установлено, что этот процесс играет важную роль в осуществлении стимулирующего действия ТФР- β на процесс сокращения коллагенового геля фибробластами. Блокирующее влияние антагонистов транспорта Ca^{2+} на клеточную пролиферацию наиболее выражено для клеток, культивируемых в условиях, наиболее благоприятных для осуществления митогенного действия изученных факторов роста.

Ключові слова: Нормальні та пухлинні клітини, вхід кальцію у клітини, вихід кальцію з клітин, блокатори транспорту кальцію, скорочення колагенового гелю, проліферація клітин.

