

## ГЕНОМ И ЕГО РЕГУЛЯЦИЯ

### Продукція стресових білків у механізмі формування вторинної радіорезистентності клітин карциноми Герена щурів

В. А. Зінченко\*, Л. О. Осипова, В. А. Барабой

Український НДІ онкології та радіології МОЗ України  
252022 Київ, вул. Ломоносова, 33/43

*Дія іонізуючої радіації у дозі 8 Гр індукує у клітинах карциноми Герена щурів експресію стресових білків (СБ) з молекулярною масою 47, 69/70, 80/82, 107 і 140/150 кДа. Останній білок не експресується за інших умов. Протягом формування вторинної набутої радіорезистентності (курс опромінення у дозі 50 Гр за п'ять фракцій чергування з перевивкою) білок з м. м. 140/150 кДа виявляється не лише після тестуючого опромінення, але і його синтез стає конститутивним.*

Вступ. Продукція стресових білків відіграє істотну роль у механізмі клітинного стресу як відповіді клітини на дію екстремальних чинників різної природи. У 1962 р. [1, 2] було відкрито реакцію геному дрозофіли на дію відносно високої температури — виникнення нових пуфів і регресію старих у велетенських політенних хромосомах слинових залоз. Подальші дослідження виявили універсальність цієї реакції синтезу термічно експресованими генами «нових» білків теплового шоку (БТШ) [1—5]. Зараз відомо, що синтез БТШ являє собою надзвичайно еволюційно давню універсальну реакцію клітин на дію не тільки термічного, а й численних інших екстремальних агентів середовища (арсеніт, важкі метали, гідроксиламін, ротенон, йодацетамід, етанол, пуроміцин тощо). Істотно, що до індукторів продукції БТШ (їх зараз точніше називати стресовими білками — СБ) належать  $H_2O_2$ , супероксидний та інші вільні окислювальні радикали, тобто агенти, які є продуктом первинної взаємодії іонізуючої радіації з живими системами [4—6]. З цього випливає, що і дія радіації причетна до продукції СБ [3]. Стосовно функції СБ та механізмів їх дії існує кілька більш-менш обґрунтованих гіпотез [6—10]. Ми вважаємо, що в механізмі їх індукції певну роль відіграє утворення активних форм кисню, що виникають під впливом не тільки радіації, а й багатьох інших стрес-агентів, які беруть участь у самому механізмі запуску стрес-реакції [2, 3, 6]. Незважаючи на відсутність загально визнаної концепції дії СБ, відомо, що їх продукція супроводжується істотним підвищенням стійкості клітин, організмів до дії стрес-агентів. Найбільш вивченим є стан термотолерантності (ТТ), розвиток якої передую активзації продукції БТШ [11—13]. Але характерно, що в стані ТТ клітини є стійкішими до дії й інших екстремальних факторів [4, 7, 12, 14]. На сьогодні відомо СБ п'яти класів: з

\*Correspondence address.

молекулярною масою (м. м.) 15—30; 60; 70; 90 і 100—110 кДа [1, 4, 5, 14], спектр їх залежить від природи стрес-агента.

Є досить підстав розглядати канцерогенез як хронічний стрес [15], а стійкість пухлинної тканини до дії протипухлинних агентів, зокрема до променевої терапії (ПТ), може бути пов'язана з продукцією СБ. Отже, метою дослідження було вивчення ролі СБ у формуванні вторинної радіорезистентності (РР) пухлинних клітин в експерименті.

**Матеріали і методи.** Експерименти виконано на 86 лабораторних щурах розведення УНДІОР, самців масою  $120 \pm 10$  г. Суспензію клітин карциноми Герена на фізіологічному розчині, яку одержували з 7—9-добової пухлини за рутинною методикою, вводили під шкіру задньої кінцівки щурів в об'ємі 0,5 мл. Динаміку росту пухлини контролювали шляхом реєстрації діаметрів пухлини в трьох взаємно перпендикулярних площинах. На 3—10-ту добу, після досягнення об'єму  $4,6 \pm 0,8$  см<sup>3</sup>, зону пухлини опромінювали одноразово в дозі 8 Гр (апарат РУМ-17, 180 кВ, 10 мА, фільтри 0,5 мм Си + 1,0 мм АІ, відстань 25 см, потужність дози 126 Р/хв). Через 2, 4, 8 та 24 год щурів декапітували. Клітини карциноми Герена, одержані механічним диспергуванням пухлинної тканини, суспендували в середовищі МЕМ без метіоніну, очищали суспензію низькошвидкісним центрифугуванням від загиблих клітин. До суспензії  $1 \cdot 10^6$  клітин/мл, що містила не менш 75 % живих клітин, додавали <sup>35</sup>S-метіонін (25 мкКюрі/мл). Після інкубації протягом 90 хв при температурі 37 °С в термостаті з регульованим надходженням СО<sub>2</sub> суспензію центрифугували і після дворазового відмивання лізували клітини в 0,25 мл буфера Леммлі. Після кип'ятіння протягом 5—7 хв на водяній бані і охолодження додавали маркер бромфенолової синій та зберігали при -20 °С. Перед початком електрофоретичного розділення білків з усіх проб відбирали аліквоти (50 мл), змішували з рівним об'ємом 10 %-го розчину ТХУ, осад збирали на фільтри Синпор № 6 і реєстрували радіоактивність в толуоловому сцинтиляторі на лічильнику Вексман (оцінка загального синтезу білка). Електрофорез здійснювали в 7,5 %-му або в лінійному (5—12 %) поліакриламідному гелі за Леммлі з забарвленням Кумасі та наступною (для флюорографії) обробкою 100 %-м 2,5-дифенілоксазолом в ДМСО та дистиллятом; гель покривали целофановою плівкою і висушували. Флюорограми одержували після експонування гелю з рентгенівською плівкою РВ-2 при -70 °С протягом 3—5 діб. Після проявлення і фіксації плівки інтенсивність включення міченого <sup>35</sup>S-метіоніну у білки реєстрували на лазерному денситометрі Ultrascan («LKB», Швеція).

**Результати та обговорення.** Виявлено, що на фоні загального пригнічення біосинтезу білка, викликаного впливом радіації (рис. 1),

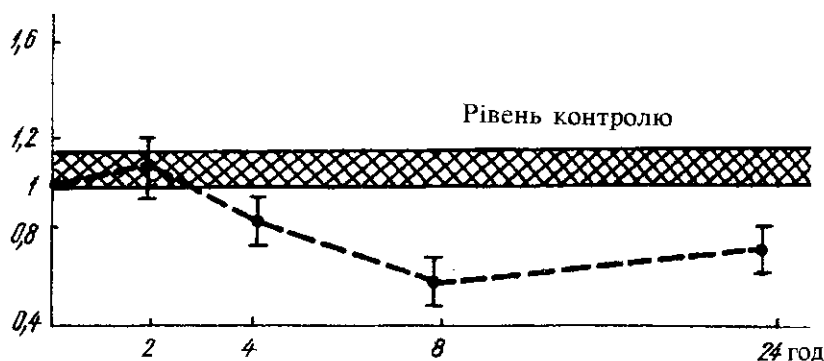


Рис. 1. Синтез загального білка в клітинах карциноми Герена після локального опромінення пухлини в дозі 8 Гр (по осі абсцис — строк після опромінення; по осі ординат — співвідношення дослід/контроль)

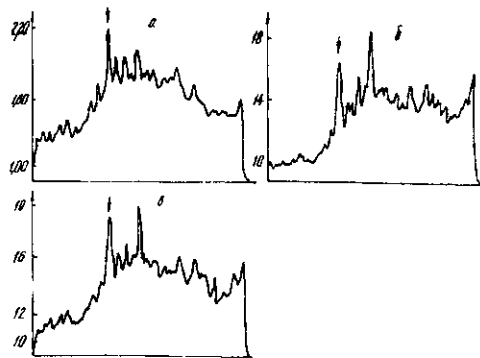


Рис. 2. Денситограми білків клітин карциноми Герена щурів: *a* — інтактною; *b, в* — після другої і третьої генерацій вторинної радіорезистентності відповідно

протягом 8 год після дії останньої (до 70 % контролю) спостерігається активація біосинтезу деяких індивідуальних білків (або груп білків) (рис. 2, *a*). Періоди підвищеного синтезу тих або інших білків не збігаються, тому їх спектри різняться в різні строки після впливу. В перші 2—4 год в клітинах карциноми Герена спостерігається найвираженіший синтез білків з м. м. 47, 69/70, 80/82, 107 та 140/150 кДа, причому перший з цих білків експресується тільки через 2 год після опромінення. Білковий спектр пептидів у клітинах карциноми Герена через 24 год після опромінення значно звужений відносно попередніх строків; клітинні лізати на цей час дуже важко піддаються фракціонуванню в поліакриламідному гелі, незважаючи на добавку значних кількостей інгібіторів протеаз (трасілолу, інгібітора з сої, PMF). Найчіткіше реєструються через 24 год після опромінення білки з м. м. 60 та 73/74 кДа. Ступінь активації їх синтезу невеликий, істотно нижчий, ніж для білків, які виявляються в більш ранні строки. При цьому синтез ранніх стресових білків через 24 год після опромінення практично не відрізняється від контролю (табл. 1).

Особливо слід наголосити на посиленні експресії білка 140—150 кДа, яке спостерігається через 2—4 год після опромінення і відсутнє як в інтактній карциномі Герена, так і в умовах термічного впливу на неї. Експресія інших СБ спостерігалася нами і в умовах опромінення, і при гіпертермії — їх можна віднести до СБ загального призначення, тоді як експресія білка 140/150 кДа специфічніша саме для ефекту опромінення.

Серед білків, що експресуються в ранні строки після променевої дії, найбільш охарактеризований функціонально білок 80/82 кДа. Він належить до кисеньрегульованих білків, синтез яких індукується гіпоксією [16].

Таблиця 1  
Посилення експресії білків карциноми Герена після опромінення\*

Молекулярна маса білка, кДа	Термін після опромінення, год			
	2	4	8	24
47	1,75	—	—	—
69/70	1,6	1,6	1,2	—
73/74	—	—	—	1,4
80	1,8	1,8	1,4	—
107	1,5	1,6	1,2	—
140/150	1,45	1,2	—	—
60	—	—	—	1,3

\*Співвідношення досліду до контролю.

Гіпоксичний ефект опромінення відомий. Вочевидь, пострадіаційна гіпоксія поряд з індукцією активних форм кисню (вільних радикалів,  $H_2O_2$ ) спричиняється також і до активації експресії СБ. Фіксація тварин під час локального опромінення пухлини також збільшує фракцію гіпоксичних клітин з 5,5 до 23—28 % [17].

Для одержання штаму карциноми Герена з вторинно набутою радіорезистентністю послідовно здійснювали курси променевої терапії (по 10 Гр × 5 фракцій, сумарно 50 Гр) з наступною трансплантацією її клітин. Всього виконано 15 послідовних пасажів пухлини. Починаючи з третього пасажу, сформувався комплекс морфологічних ознак, які характеризують особливості радіорезистентного варіанту карциноми Герена. До них належить і продукція СБ. Наші дослідження проведено з 52 лабораторними щурами-самцями масою  $120 \pm 10$  г на різних етапах формування (селекції) радіорезистентного штаму (1, 2 та 3-я генерації). Як і у варіанті індукції синтезу СБ клітинами вихідного штаму, їх піддавали додатковому опроміненню в дозі 8 Гр локально.

Встановлено, що на другому і більш чітко на третьому пасажах у клітинах карциноми Герена реєструється лише локус СБ 140/150 кДа, який відсутній в інтактних клітинах (рис. 2 а, табл. 2). Істотно, що цей білок виявляється не лише на флюорограмах (рис. 3), які дають уявлення про

Таблиця 2

Спектр білків, індукованих опроміненням у вихідному штамі карциноми Герена, та другої генерації радіорезистентності

Молекулярна маса білків вихідного штаму, кДа	Друга генерація радіорезистентності	
	Молекулярна маса білка, кДа	Рівень індукції
47	47	2,8
69	69	1,2
78/80	72/73	3
107	78/80	2,1
140—150	140—150	2,7

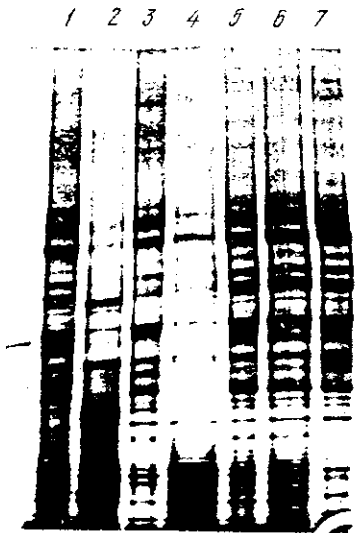


Рис. 3. Флюорограми білків з клітин карциноми Герена через 2, 4 та 8 год після опромінення (доріжки 1—3); через 4 год після гіпергермії, проведеної в ранковий або вечірній час (доріжки 4—6; доріжка 7 — маркери бичачий сироватковий альбумін та овальбумін)

знову синтезовані поліпептиди, а й на електрофореграмах після забарвлення Кумасі білків з клітин карциноми Герена відповідної генерації без індукції опроміненням. Можна вважати, що мірою селекції радіорезистентності синтез білка 140/150 кДа з індукційного перетворюється на конститутивний, тобто закріплюється генетично на певному рівні, що реєструється без додаткової дії індуктора вже на третьому пасажі. Або, якщо ґрунтуватися на уявленнях клонально-селскційної концепції пухлинного росту, в процесі формування радіорезистентності відбувається селекція клітин, яким притаманна первинно підвищена експресія білка 140/150 кДа. Останній поряд з іншими факторами та механізмами бере участь у становленні фенотипу радіорезистентності.

*В. А. Зинченко, Л. А. Осипова, В. А. Барабой*

Продукция стрессовых белков в механизме формирования вторичной радиорезистентности клеток карциномы Герена крыс

Резюме

*Воздействие ионизирующей радиации в дозе 8 Гр индуцирует в клетках карциномы Герена крыс экспрессию стрессовых белков (СБ) с молекулярной массой 47, 69/70, 80/82, 107 и 140/150 кДа. Последний белок не экспрессируется в других условиях. По мере формирования вторичной приобретенной радиорезистентности (курс облучения в дозе 50 Гр за пять фракций чередовался с перевивкой) белок с м. м. 140/150 кДа выявляется уже не только после тестирующего облучения, но становится конститутивным.*

*V. A. Zinchenko, L. A. Osipova, V. A. Baraboy*

Production of stress proteins in mechanism of forming of secondary radioresistance of rat cells of Geren carcinoma

Summary

*Influence of ionizing radiation at a dose of 8 Gy induces the expression of stress proteins (SP) 47, 69/70, 80/82, 107 and 140/150 kDa in rat cells of Geren carcinoma. The latter protein is not expressing under the other conditions. As far as forming of secondary acquired radioresistance (course of radiation 50 Gy alternated with innoculation) protein 140/150 is being detected not only after testing radiation but becomes constitutive.*

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Блехман Г. И. Синтез белка в условиях стресса // Успехи соврем. биологии.—1987.—103, № 3.—С. 340-353.
2. Барабой В. А., Гресс В. Э. Стрессовые белки: природа и биологическая роль у млекопитающих // Актуальные проблемы медицины и биологии.—1988.—2.—С. 420—432.
3. Барабой В. А. Клеточный стресс, стрессовые белки и устойчивость живых систем // Там же.—1993.—1.—С. 12—18.
4. Nover L., Hellmund D., Neumann D. et al. The heat shock response of eukaryotic cells // Biol. Zbl.—1984.—103, N 2.—P. 357—435.
5. Burdon R. H. Heat shock and heat shock proteins // Biochem. J.—1986.—240.—P. 313—324.
6. Burdon R. H., Gill V., Evans C. R. Active oxygen species and heat shock proteins // Stress proteins induction and function.—Berlin: Springer, 1990.—P. 19—25.
7. Black A. R., Subject J. R. Mechanisms of stress-induced thermo- and chemotolerances // Ibid.—P. 101—117.
8. Hunt C., Morimoto R. J. Conserved features of eukaryotic *hsp70* genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human *hsp70* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1985.—82.—P. 6455—6459.
9. Welch W. J., Suhan I. P. Morphological studies of the mammalian stress response // J. Cell. Biol.—1985.—101.—P. 1198—1211.
10. Rose D. W., Welch W. J., Kramer G., Hardesty B. Possible involvement of the 90-kDa heat shock protein in the regulation of protein synthesis // J. Biol. Chem.—1989.—264.—P. 6239—6244.
11. Linquist S. The heat shock response // Amer. Rev. Biochem.—1986.—55.—P. 1151—1191.

12. Ananthan J., Goldberg A. L., Voelling R. Abnormal proteins as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes // *Science*.—1986.—232, N 4749.—P. 522—524.
13. Li G. S. Elevated levels of 70 000 dalton heat shock protein in transiently thermotolerant chinese hamster fibroblasts and their stable heat resistant variants // *Int. J. Radiat. Oncol., Biol., Phys.*—1985.—11.—P. 165—117.
14. *Stress proteins in biology and medicine* / Eds R. J. Marimoto, A. Tiesberes, G. Georgopoulos.—New York: Cold Spring Harbor Lab., 1991.—50 p.
15. Барабой В. А., Орел В. Э., Карнаух И. М. Перекисное окисление и радиация.—Киев: Наук. думка, 1991.—256 с.
16. Roll D., Murphy B., Luderoute K., Sutherland R. S. Oxygen regulated 80 kDa protein and glucose regulated 78 kDa protein are identical // *Mol. and Cell. Biochem.*—1991.—103, N 1.—P. 141—148.
17. Shibamoto Y., Sasai K., Abe M. The radiation response of SCCVII tumor cells in C<sub>3</sub>H/He mice varies with the radiation conditions // *Radiat. Res.*—1987.—109, N 2.—P. 352—354.