



УДК 576.355

Р. С. Стойка, С. І. Сушельницький, С. Й. Кусень

ВПЛИВ ТРАНСФОРМУЮЧОГО ФАКТОРА РОСТУ β , ЕПІДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТУ ТА ІНСУЛІНУ НА БІОСИНТЕЗ ДНК У МИШАЧИХ ФІБРОБЛАСТАХ ЛІНІЇ SWISS-3T3 ЗА НИЗЬКОЇ І ВИСОКОЇ ЩІЛЬНОСТІ КЛІТИН У МОНОШАРОВІЙ КУЛЬТУРІ

Виявлено, що вплив різних поєднань трансформуючого фактора росту (0,05—50,0 нг/мл), епідермального фактора росту (5,0 нг/мл) і інсуліну (1 мкг/мл) на біосинтез ДНК у мишачих фібробластах лінії Swiss-3T3 істотно відрізняється за умов низької та високої щільності клітин у моношаровій культурі.

Вступ. Молекулярні механізми, які визначають контактне пригнічення росту клітин, що знаходяться у щільних моношарових культурах, досі є малозрозумілими. Деякі дослідники вважають, що за умов конфлюєнта клітини «екранують» доступ молекул стимуляторів росту до їх специфічних рецепторів на поверхні сусідніх клітин [1]. Виявлено також, що із збільшенням щільності клітин у культурі зменшується кількість клітинних рецепторів цілого ряду поліпептидних факторів росту [2, 3]. Крім того, контактне пригнічення проліферації пов'язують з експресією окремих глікопротеїнів на поверхні клітин, хоча конкретні їх функції поки ще вивчені недостатньо [4].

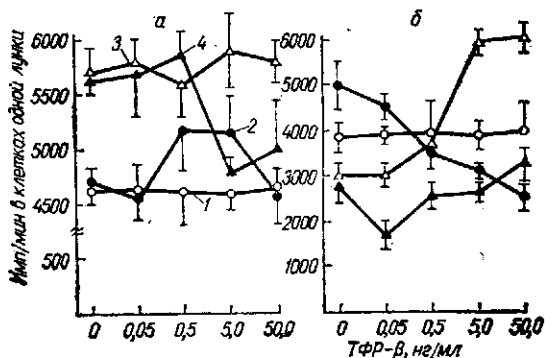
Ми досліджували ефективність різних поєднань поліпептидних факторів росту на біосинтез ДНК у мишачих фібробластах лінії Swiss-3T3 за умов рідкої і щільної культур. При цьому враховували, що окремі фактори росту можуть впливати не тільки на специфічне зв'язування [5, 6], але й на рострегулюючу дію [7, 8] один одного. Це відноситься і до трансформуючого фактору росту β (ТФР- β), котрий в залежності від типу клітин-мішеней [7] та умов їх культивування [8] може діяти як стимулятор або інгібітор біосинтезу ДНК і проліферації клітин, причому його регуляторні ефекти залежать від наявності у середовищі інших поліпептидних факторів росту.

Матеріали і методи. Фібробласти лінії Swiss-3T3 з нормальних ембріонів миші отримані з Всесоюзної колекції клітинних культур при Ін-ті цитології РАН (Санкт-Петербург). Клітини культивували у середовищі Ігла, модифікованому Дальбекко («Flow Laboratory», Великобританія) з додаванням 10 % сироватки крові плодів великої рогатої худоби (Підприємство діагностичних та лікувальних препаратів «Діалек», Мінськ). Клітини, суспендовані у культуральному середовищі, яке містило 0,1 % сироватки крові, висівали до 24-вічкових пластикових планшетів («Flow Laboratory»). Кількість клітин у рідкій культурі складала 10^4 /вічко, у щільній — 10^5 /вічко. До середовища додавали різні кількості ТФР- β (0,05—50,0 нг/мл), епідермальний фактор росту (ЕФР, 5,0 нг/мл), інсулін (1 мкг/мл) або різні поєднання наведених факторів росту. Клітини інкубували у CO_2 -термостаті на про-

тязі 24 год. В останні 18 год інкубації до середовища додавали ^3H -тимідин (18,5 Бк/мл). У подальшому клітини обробляли за загально визнаним методом [8], визначаючи радіоактивність у ТХО-нерозчинному осаді за допомогою сцинтиляційного лічильника Mark III («Tracor», Нідерланди). ТФР- β був отриманий нами з тромбоцитів крові свині, як списано раніше [6]. У роботі використовували ЕФР з підщелепних слинних залоз миші («Serva», Німеччина) та інсулін з підшлункової залози свині («Sigma», США).

Результати і обговорення. З даних, наведених на малюнку, видно, що сам ТФР- β незалежно від концентрації, яку використовують, не

Вплив ТФР- β та його поєднань з ЕФР і (або) інсуліном на інтенсивність включення ^3H -тимідину до ДНК мишачих фібробластів лінії Swiss-3T3 за різної щільності клітин у моношаровій культурі: а—щільна культура (10^8 клітин/2 см 2); б—рідка культура (10^4 клітин/2 см 2); 1—ТФР- β ; 2—ТФР- β +ЕФР; 3—ТФР- β +інсулін; 4—ТФР- β +ЕФР+інсулін. Вертикальні відрізки—95%-ві певні інтервали середніх значень



впливає на біосинтез ДНК як у рідкій, так і у щільній культурах мишачих фібробластів лінії Swiss-3T3. Інсулін у першому випадку не діє на цей процес, в другому — стимулює його. У щільній культурі клітин ТФР- β у присутності інсуліну не впливає на біосинтез ДНК. В той же час дія такого поєднання факторів росту на клітини, які знаходяться у рідкій культурі, залежить від концентрації ТФР- β у середовищі. Так, за низьких концентрацій (0,05—0,5 нг/мл) ТФР- β не виявлено змін в інтенсивності біосинтезу ДНК, тоді як за відносно високих його концентрацій (5,0—50,0 нг/мл) спостерігається істотна стимуляція включення ^3H -тимідину до ДНК.

Власне ЕФР вірогідно не впливає на біосинтез ДНК у фібробластах лінії Swiss-3T3 у щільній культурі, але стимулює цей процес у рідкій культурі. Між клітинами лінії, яка досліджується, в залежності від їх щільності у культурі виявляються суттєві розбіжності також у дії ЕФР у присутності різних концентрацій ТФР- β . Так, у щільній культурі ТФР- β імовірно не впливає на рострегулюючу дію ЕФР, тоді як у рідкій культурі з підвищенням концентрації ТФР- β відбувається пригнічення біосинтезу ДНК, індукованого ЕФР.

При одночасному впливі на досліджувані клітини ЕФР і інсуліну біосинтез ДНК в них незалежно від щільності у культурі залишається на рівні, характерному для впливу власне інсуліну. Додавання до тест-системи ще й ТФР- β за умов щільного висівання клітин сприяє пригніченню ростстимулюючої дії інсуліну, причому цей ефект виявляється тільки у присутності відносно високих концентрацій ТФР- β (5,0—50,0 нг/мл). Тим часом за умов рідкої культури вірогідного впливу ТФР- β на ростстимулюючу дію ЕФР і інсуліну на клітини лінії Swiss-3T3 не відзначено.

Таким чином, спрямованість і вияв впливу ТФР- β , ЕФР та інсуліну на біосинтез ДНК у мишачих фібробластах лінії Swiss-3T3 істотно залежить від щільності клітин у культурі. Крім того, виявлено, що рострегулюючі ефекти ЕФР і (або) інсуліну можуть модулюватися ТФР- β у різному ступені в залежності від його концентрації у середовищі.

Загально відомо, що інтенсивність проліферації клітин у конфлюентних культурах суттєво нижча, ніж у рідких культурах. Виявлено

також, що із збільшенням щільності клітин у моношаровій культурі в них зменшується кількість специфічних рецепторів ЕФР, ТФР- β , фактору росту фібробластів, фактору росту з тромбоцитів, інсуліноподібних факторів росту I та II [2, 3]. На підставі цих даних висунуто припущення про те, що таке зменшення кількості рецепторів у розрахунку на одну клітину є одним з універсальних механізмів обмеження її здатності у нормі проліферувати за умов високої щільності на одиницю площі підкладки [2, 3].

Показано, що у клітинах лінії BSC-1 з нирки мавпи за великої щільності у культурі не тільки зменшується специфічне зв'язування ЕФР, але й майже втрачається здатність останнього стимулювати проліферацію [9]. Аналогічно фібробласти шкіри людини у щільних культурах мають значно менше рецепторів інсуліноподібного фактору росту I, ніж у рідких культурах, і тому потребують істотно більш високих концентрацій даного фактору росту для стимуляції своєї проліферації [10].

Використовуючи фібробластоподібні шурячі клітини лінії NRK-49F, Рицино з співавт. [3] відзначили, що при збільшенні щільності клітин у стандартному 16-мм вічку планшету від $1,77 \cdot 10^4$ до $15,76 \cdot 10^4$, тобто приблизно у 10 разів, величина відносного зв'язування ТФР- β зменшується майже у 3 рази. Приблизно така ж закономірність спостерігається у випадку використання клітин інших типів. Згадані автори, проте, не наводять даних про те, як за цих умов змінюється ристрегулююча дія ТФР- β .

За даними Гудмана і Маяка [4], ТФР- β пригнічує проліферацію гладком'язевих клітин аорти щура у рідких культурах ($(2,0-2,5) \cdot 10^3$ клітин/см²), але стимулює її у конфлюентних культурах ($5,0 \cdot 10^4$ клітин/см²). Рівень специфічного зв'язування ТФР- β у першому випадку більш ніж у 2 рази вищий порівняно з другим. Необхідно відзначити, що у рідких культурах цих клітин виявляються два типи рецепторів— з високою і низькою спорідненістю до ТФР- β . Крім того, між гладком'язевими клітинами з рідких і щільних культур існують розбіжності у складі молекулярних форм специфічних рецепторів ТФР- β [4]. З результатів цих досліджень можна зробити висновок про те, що ефективність ростостимулюючої дії ТФР- β визначається не тільки однією кількістю рецепторів даного фактору росту. Мабуть, існують й інші механізми, які впливають на спрямованість проліферативної відповіді клітин на дію ТФР- β за умов конфлюентної та рідкої культур.

Є відомості про те, що окремі поліпептидні фактори росту можуть змінювати рівень специфічного зв'язування один одного. Наприклад, ТФР- β регулює зв'язування ЕФР [5], а ЕФР і (або) інсулін — зв'язування ТФР- β [6]. Тому було доцільним проведення порівняльного вивчення впливу ТФР- β , ЕФР, інсуліну та різних поєднань цих факторів росту на інтенсивність біосинтезу ДНК у псевдонормальних мишачих фібробластах лінії Swiss-3T3 за умов щільної і рідкої культури. Використання різних сполучень поліпептидних факторів росту дозволило врахувати взаємний вплив кожного з них окремо на біологічну дію один одного.

Можна з певністю сказати, що серед відомих факторів росту останнім часом найбільшою увагою користується ТФР- β . Це обумовлено цілим рядом його структурно-функціональних особливостей, серед яких необхідно в першу чергу відзначити унікальну здатність цього фактору виявляти різноспрямований вплив на проліферацію не тільки клітин з різних тканин [7], але й однотипових клітин, що знаходяться за різних умов культивування [8]. Серед умов, які найбільш суттєво впливають на спрямованість та виразність проліферативної відповіді клітин на дію ТФР- β , відзначають прикріпленість клітин до субстрата-підкладки, концентрацію сироватки крові у культуральному середовищі, наявність в ньому інших поліпептидних факторів росту, тривалість взаємодії клітин з ТФР- β [7, 8, 11].

Як видно з результатів нашої роботи, окремі поліпептидні фактори росту здійснюють взаємний вплив на рострегулюючі властивості один одного. Наприклад, за умов рідкої культури біосинтез ДНК у мишачих фібробластах лінії Swiss-3T3 найбільш інтенсивно відбувається у присутності інсуліну та високих концентрацій ТФР- β , а найменш інтенсивно — при дії ЕФР та високих концентрацій ТФР- β . Ці закономірності не виявляються за умов щільної культури клітин. Тут біосинтез ДНК відбувається з максимальною інтенсивністю у присутності інсуліну, з мінімальною — у присутності ЕФР, причому в обох випадках ці процеси мало залежать від одночасної дії на клітини ТФР- β . Отже, за умов рідкої культури фібробласти лінії Swiss-3T3 більше піддаються рострегулюючому впливові ТФР- β , ніж за умов щільної культури, а спрямованість цієї регуляторної дії істотно залежить від впливу інших поліпептидних факторів росту, які знаходяться у середовищі.

Раніше нами [6] було показано, що ЕФР і (або) інсулін по-різному впливають на рівень специфічного зв'язування ТФР- β псевдонормальними фібробластоподібними клітинами лінії Swiss-3T3 та карциномними клітинами лінії A-549. Зокрема, від дії інсуліну зростає кількість локусів зв'язування ТФР- β у клітинах лінії NRK-49F, а від дії ЕФР та інсуліну — вона зменшується. ЕФР викликає збільшення кількості локусів зв'язування ТФР- β у карциномних клітинах лінії A-549. Все це відбувається без істотних змін K_d рецепторів ТФР- β .

Не виключено, що виявлені нами розбіжності у дії різних поєднань поліпептидних факторів росту на інтенсивність біосинтезу ДНК у псевдонормальних мишачих фібробластах лінії Swiss-3T3 також якись чиним пов'язані із зміною кількості рецепторів одних факторів росту під впливом інших. З'ясування таких механізмів у першу чергу необхідно при вивченні біологічної дії ТФР- β . Адже цей фактор росту має виключну поліфункціональність і може чинити як стимулюючу, так і пригнічуючу дію на профілеративну активність клітин [11].

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Lieberman M. A., Raben D., Glaser L. Cell surface-associated growth inhibitory proteins // *Exp. Cell Res.*— 1981.— 133, N 2.— P. 413—419.
2. Cell density regulates the number of cell surface receptors for fibroblast growth factor / G. Veomett, C. Kuszynski, P. Kazakoff, A. Rizzino // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*— 1989.— 159, N 2.— P. 694—700.
3. Rizzino A., Kazakoff P., Nebelsick J. Density-induced down regulation of epidermal growth factor receptors // *In Vitro Cell. Devel. Biol.*— 1990.— 26, N 5.— P. 537—542.
4. Goodman L. V., Majack R. A. Vascular smooth muscle cells express distinct transforming growth factor- β receptor phenotypes as a function of cell density in culture // *J. Biol. Chem.*— 1989.— 264, N 9.— P. 5241—5244.
5. Assoian R. K. Biphasic effects of type β transforming growth factor on epidermal growth factor receptors in NRK fibroblasts // *Ibid.*— 1985.— 260, N 17.— P. 9613.
6. Сушельницький С. И., Стойка Р. С., Кусень С. И. Влияние эпидермального фактора роста и инсулина на специфическое связывание трансформирующего фактора роста β клетками линий NRK-49F и A-549 // *Цитология.*— 1991.— 33, № 3.— С. 80—87.
7. Влияние трансформирующего фактора роста β -типа и его комбинаций с эпидермальным фактором роста и инсулином на субстратнезависимую пролиферацию нормальных и опухолевых клеток / С. И. Сушельницький, Р. С. Стойка, С. И. Гарасько и др. // *Там же.*— 1989.— 31, № 7.— С. 767—774.
8. Стойка Р. С., Сушельницький С. И., Кусень С. И. Влияние трансформирующего фактора роста β на интенсивность синтеза ДНК клеток в зависимости от их типа и условий культивирования / *Там же.*— 1990.— 32, № 2.— С. 132—139.
9. Density-dependent regulation of growth of BSC-1 cells in cell culture: Control of growth by serum factors / R. W. Holley, R. Armour, J. H. Baldwin et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*— 1977.— 74, N 12.— P. 5046—5050.
10. Rosenfeld R. G., Dollar L. A., Conover C. A. Density-associated loss of functional receptors for somatomedin-C/insulin-like growth factor I (SM-C/IGF-I) on cultured human fibroblast monolayers // *J. Cell. Physiol.*— 1984.— 121, N 4.— P. 419—424.
11. Стойка Р. С., Кусень С. И. Трансформирующий фактор роста β — новый тип ингибитора пролиферации нормальных и опухолевых клеток // *Молекуляр. биология.*— 1990.— 24, № 4.— С. 897—908.