

ЧОРНА ІННА ВАЛЕНТИНІВНА

УДК 577.391:615.277.3:577.17.087:616-006.6

ВПЛИВ ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ ТА ПРОТИПУХЛИННИХ
ПРЕПАРАТІВ НА РЕГУЛЯТОРНУ СИСТЕМУ ТРАНСФОРМУЮЧОГО ФАКТОРА
РОСТУ БЕТА У КЛІТИНАХ КАРЦИНОМИ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ
З РІЗНОЮ РЕЗИСТЕНТНІСТЮ ДО ДОКСОРУБЦИНУ

03.00.04 – біохімія

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Львів – 2006

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Львівському національному університеті імені Івана Франка МОН України.

Науковий керівник – доктор біологічних наук, професор
Стойка Ростислав Степанович,
Інститут біології клітини НАН України,
завідувач відділу регуляції проліферації клітин.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Сологуб Леонід Ілліч,
Інститут біології тварин УААН,
завідувач лабораторії обміну речовин;

доктор біологічних наук, професор
Калачнюк Григорій Іванович,
Науково-дослідний інститут біотехнологічних
основ підвищення продуктивності тварин
Львівської національної академії ветеринарної
медицини імені С.З. Гжицького,
директор, професор кафедри органічної і неорганічної
хімії.

Провідна установа – Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р.Є. Кавецького НАН України, відділ механізмів протипухлинної терапії, м. Київ.

Захист відбудеться “6” червня 2006 р. о 12 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 35.368.01 в Інституті біології тварин УААН за адресою: 79034, м. Львів, вул. В. Стуса, 38.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біології тварин УААН за адресою: 79034, м. Львів, вул. В. Стуса, 38.

Автореферат розісланий “5” травня 2006 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

Віщур О.І.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Відомо, що різні екстремальні чинники, у тім числі іонізуюча радіація, індукують продукцію цитокінів клітинами-мішенями *in vitro* (Goldberg Z. et al., 2002; Stoika R. et al., 2003; Teicher B.A., 2001) та *in vivo* (Barcellos-Hoff M.H., 1998; Kim S.H. et al., 2002). ТФР- β є цитокіном системної дії, що бере участь у сигнальних шляхах, які контролюють ріст, диференціацію та апоптоз нормальних і пухлинних клітин (Фильченков А.А. и др., 1994; Moustakas A. et al., 2002; Souchelnytskyi S., 2002). Біологічна дія ТФР- β реалізується за участю трансмембранних рецепторів ТФР- β та внутрішньоклітинних білків Smad (Dennler S. et al., 2002; ten Dijke P. et al., 2004). Однак, маловивченими залишаються молекулярні механізми, які опосередковують дотичність шляхів передавання регуляторного сигналу ТФР- β з механізмами стійкості злоякісних клітин до дії стресових чинників.

Виникнення резистентності пухлинних клітин до дії протипухлинних препаратів є серйозною перешкодою під час лікування онкологічних хворих. Тому поєднання хіміо- та радіотерапії систематично застосовують у клініці з метою подолання цієї проблеми. Незважаючи на те, що іонізуюче випромінювання слугує ефективним засобом лікування низки злоякісних новоутворень, суттєві відмінності існують у результатах радіотерапевтичного лікування пухлин різного гістологічного походження (Ross G.M. et al., 1999). Окрім того, існує також можливість розвитку перехресної резистентності злоякісних клітин до дії хіміопрепаратів та радіації, однак механізми виникнення такої перехресної резистентності недостатньо вивчені.

Отже, з'ясування ролі ТФР- β в опосередкуванні відповіді злоякісних клітин на дію радіації та протипухлинних препаратів може забезпечити основу для розробки нових підходів щодо підвищення ефективності радіо- та хіміотерапії або для більш точного передбачення наслідків такого лікування. У роботі використано клітини карциноми молочної залози людини, що характеризуються різною чутливістю до протипухлинного препарату доксорубіцину. Встановлено, що ці клітини також відрізняються за чутливістю до рентгенівського випромінювання, зокрема за механізмами, в яких бере участь ТФР- β . Ці механізми вивчено на клітинному та молекулярному рівнях.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана у межах держбюджетної теми Бх-02Ф кафедри біохімії Львівського національного університету імені Івана Франка “Вплив рентгенівського випромінювання на регуляторні системи, відповідальні за апоптоз імунокомпетентних і пухлинних клітин” (№ державної реєстрації 0105U002211), в якій автор досліджувала експресію про- та антиапоптичних білків в опромінених пухлинних клітинах. За угодою про наукову співпрацю біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка та Інституту біології клітини НАН України окремі дослідження виконані у відділі регуляції проліферації клітин Інституту біології клітини НАН України в межах теми відділу “Дослідження молекулярних механізмів резистентності пухлинних клітин до дії трансформуючого

фактора росту бета 1” (№ державної реєстрації 0104U010049), в якій автор досліджувала продукцію ТФР- β та експресію компонентів сигнального шляху цього цитокіна за умов дії екстремальних чинників.

Мета і завдання дослідження. Мета роботи – з’ясувати роль сигнальної системи трансформуючого фактора росту β за умов дії іонізуючого випромінювання та протипухлинних препаратів на клітини лінії MCF-7 карциноми молочної залози людини з різною стійкістю до доксорубіцину.

Для досягнення поставленої мети вирішували наступні завдання:

- 1) порівняти вплив іонізуючого випромінювання на ріст та виживання клітин лінії MCF-7, чутливих та резистентних до цитотоксичної дії доксорубіцину;
- 2) дослідити секрецію ТФР- β під впливом рентгенівського опромінення у клітинах лінії MCF-7 з різною чутливістю до доксорубіцину;
- 3) визначити та порівняти вплив іонізуючого випромінювання та протипухлинних препаратів доксорубіцину, цисплатину та метотрексату на рівень мРНК ТФР- β_1 і ТФР- β_2 у клітинах лінії MCF-7, чутливих та резистентних до доксорубіцину;
- 4) дослідити вплив іонізуючого випромінювання та протипухлинних препаратів на експресію головних компонентів сигнального шляху ТФР- β , таких як специфічні рецептори (на рівні мРНК) та білки Smad (внутрішньоклітинні ефектори передавання регуляторного сигналу цього цитокіну) у клітинах лінії MCF-7 з різною чутливістю до дії доксорубіцину;
- 5) дослідити вплив іонізуючого опромінення та протипухлинних препаратів на експресію про- та антиапоптичних білків у клітинах лінії MCF-7, резистентних до дії доксорубіцину, порівняно з їхніми чутливими попередниками;
- 6) визначити ступінь пошкоджень ДНК під впливом рентгенівського опромінення та їхню репарацію у клітинах досліджуваних ліній.

Об’єкт дослідження. Регуляторна система трансформуючого фактора росту β у клітинах лінії MCF-7 карциноми молочної залози людини за умов дії екстремальних чинників.

Предмет дослідження. Вплив рентгенівського випромінювання та протипухлинних препаратів (цисплатин, доксорубіцин, метотрексат) на експресію головних компонентів сигнального шляху трансформуючого фактора росту β у клітинах лінії MCF-7 (карцинома молочної залози людини) з різною стійкістю до доксорубіцину.

Методи дослідження. Для досягнення мети та виконання завдань, поставлених у дисертаційній роботі, було використано: електрофорез білків у поліакриламідному гелі, імуноблот-аналіз білків, RT-PCR (полімеразна ланцюгова реакція з використанням зворотної транскриптази), спектрофотометрію, комет-аналіз ДНК, біотестування активності трансформуючого фактора росту β , цитоморфологічні методи дослідження та статистичні методи обробки результатів.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше встановлено, що резистентність клітин лінії MCF-7 карциноми молочної залози людини до протипухлинного препарату доксорубіцину корелює з їхньою стійкістю до інгібування росту та загибелі під дією рентгенівського випромінювання.

Виявлено здатність рентгенівського випромінювання індукувати експресію ТФР- β на рівні мРНК, а також викликати зростання секреції цього цитокіна клітинами лінії MCF-7 карциноми молочної залози людини, чутливими та резистентними до доксорубіцину.

Вперше з'ясовано, що зниження чутливості до впливу випромінювання у резистентних до доксорубіцину клітинах лінії MCF-7, принаймні частково, спричинене зниженням під дією радіації рівня мРНК рецепторів ТФР- β I та II типів.

Протипухлинний препарат доксорубіцин викликав зниження рівня мРНК рецепторів I та II типів і посилення експресії інгібіторного білка Smad7 у резистентних до доксорубіцину клітинах лінії MCF-7, а також зниження рівня мРНК рецептора II типу у чутливих до доксорубіцину клітинах цієї лінії.

Вперше досліджено, що порівняно з чутливими до доксорубіцину клітинами лінії MCF-7, у резистентних клітинах рентгенівське випромінювання не індукувало експресії проапоптичних білків p53, Bax, Bad. Виявлено відмінності в електрофоретичній рухливості білка Bcl-2 між чутливими та резистентними до доксорубіцину клітинами даної лінії.

Відзначено нижчий рівень пошкодження ДНК під впливом рентгенівського випромінювання та швидшу репарацію цього пошкодження у клітинах лінії MCF-7, резистентних до дії доксорубіцину.

Практичне значення одержаних результатів. Результати, представлені у дисертаційній роботі, дозволяють краще зрозуміти роль ТФР- β в опосередкуванні впливу екстремальних чинників (рентгенівське випромінювання та деякі протипухлинні препарати) на ракові клітини, що відрізняються за стійкістю до протипухлинного препарату доксорубіцину. Ці результати можуть бути корисними у з'ясуванні механізмів виникнення перехресної резистентності злоякісних клітин до дії протипухлинних препаратів і радіації. Вони можуть бути експериментальним підґрунтям для розроблення більш ефективних схем радіо- та хіміотерапевтичного лікування онкологічних хворих.

Одержані результати і узагальнення, що стосуються особливостей проходження регуляторного сигналу ТФР- β у пухлинних клітинах за умов дії рентгенівського випромінювання та протипухлинних препаратів, використовують при викладанні спецкурсів “Молекулярні механізми регуляції проліферації і диференціації клітин”, “Молекулярні механізми трансдукції клітинних сигналів”, “Молекулярні механізми міжклітинної комунікації”, “Радіаційна біохімія” на кафедрі біохімії біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка.

Особистий внесок здобувача. Дисертант самостійно опрацювала літературу за темою дисертаційної роботи, виконала експериментальну частину і статистично

обробила отримані результати. Аналіз і обговорення отриманих даних проведені спільно з науковим керівником, професором Стойкою Р.С.

Апробація результатів дисертації. За матеріалами дисертації зроблено доповіді на Шостій конференції молодих онкологів України “Сучасні проблеми експериментальної та клінічної онкології” (Київ, 2003 р.), Першому (Установчому) з’їзді Українського товариства клітинної біології (Львів, 2004 р.), засіданнях Наукового Товариства імені Т. Шевченка (Львів, 2004 і 2005 рр.), П’ятій Парнасівській конференції “Молекулярні механізми клітинного сигналювання” (Київ, 2005 р.), щорічних звітних конференціях біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка (2004, 2005 і 2006 рр.).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 11 наукових праць, з них 4 – у фахових періодичних виданнях, 1 – у тематичному збірнику праць, 6 – у матеріалах конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, 4-х розділів (огляд літератури, методи досліджень, результати досліджень, аналіз і узагальнення результатів досліджень), висновків та списку використаних джерел, який містить 294 найменування. Робота охоплює 153 сторінки, містить 40 рисунків (24 сторінки).

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. Описано молекулярні механізми, внаслідок порушення яких відбувається трансформація нормальних клітин у пухлинні. Значну увагу приділено розгляду структури, біосинтезу та сигнального шляху ТФР- β . Проаналізовано сучасну інформацію про механізми дії на клітини іонізуючого випромінювання та деяких протипухлинних препаратів, зокрема, доксорубіцину, метотрексату, цисплатину. Висвітлено механізми індукції апоптозу, порушення яких у ракових клітинах є однією з причин низької ефективності радіо- та хіміотерапії.

Матеріали та методи досліджень. Дослідження проводили на клітинах лінії MCF-7 аденокарциноми молочної залози людини, чутливих (MCF-7 (wt)) та стійких (MCF-7 (DOX/R)) до дії доксорубіцину, які були отримані з колекції клітинних культур Інституту онкології (Глівіце, Польща). Клітини вирощували в середовищі Ігла, модифікованому Дальбекко (DMEM, “Sigma”, США), за присутності 10% декомплементації ембріональної сироватки великої рогатої худоби (FCS, “Sigma”, США) і 50 мкг/мл гентаміцину (“Sigma”, США). Клітини опромінювали на рентгенівській установці “РУМ-17” (СРСР) або інкубували у присутності одного з протипухлинних препаратів: доксорубіцину, цисплатину (“Ebewe”, Австрія) чи метотрексату (“Leberle”, США).

Вплив рентгенівського випромінювання на ріст і виживання клітин визначали після їхнього фарбування 0,1% розчином трипанового синього та підрахунку в камері Фукса-Розенталя зафарбованих (мертві) і незафарбованих (живі) клітин. Зміни у морфології опромінених клітин оцінювали шляхом їх прижиттєвого фарбування флюорохромним барвником акридиновим оранжевим (3,6-диметиламіноакридин), а

також зафарбовуванням фіксованих препаратів клітин флюоресцентним барвником DAPI (4,6-діамідино-2-феніліндол) (“Sigma”, США).

Секрецію ТФР- β клітинами лінії MCF-7 визначали біологічним тестуванням, використовуючи клітини лінії CCL-64 епітелію легені норки (Danielpour D. et al., 1989; Garrigue-Antar L. et al., 1995) та застосовуючи сульфородамін В (“Sigma”, США) (Skehan P. et al., 1990).

Для вивчення експресії ТФР- β_1 , ТФР- β_2 , рецепторів ТФР- β I та II типів на рівні мРНК, з клітин лінії MCF-7 виділяли сумарну РНК, використовуючи реагент Trizol (“Life Technologies”, США) згідно з методикою, рекомендованою виробником. Для отримання однострочної кДНК, придатної до RT-PCR (полімеразна ланцюгова реакція з використанням зворотної транскриптази) аналізу, здійснювали зворотню транскрипцію 5 мкг препарату РНК з використанням набору “RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit” (“Fermentas”, Литва) за рекомендаціями виробника. Відбирали рівні кількості (4 мкл) продуктів зворотної транскрипції і проводили їх PCR-ампліфікацію із різними парами праймерів. Продукти PCR візуалізували на 2% агарозному гелі за допомогою етидію броміду (0,5 мкг/мл). Кількісний аналіз проводили за допомогою програми Gel-Pro Analyzer v3.1.00.00 (“Media Cybernetics”, США). Як стандарт для нормалізації кількості РНК використовували рівень мРНК β -актину.

Рівень експресії білків вивчали за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі та імуноблот-аналізу із використанням кролячих поліклональних анти-Smad2, Smad3, Smad4, Smad7, Smad2-P (Людвігівський Інститут Ракових Досліджень, м. Уппсала, Швеція), кролячих поліклональних анти-p53 (“Sigma”, США), анти-Bcl-2 (“Santa Cruz”, США), мишачих моноклональних анти-Bad, anti-Bax (“Santa Cruz”, США) антитіл. Кількісну обробку специфічних білкових смуг здійснювали за допомогою комп’ютерної програми Gel-Pro Analyzer v3.1.00.00 (“Media Cybernetics”, США). Рівень експресії специфічних білків визначали після нормалізації даних за β -актином.

Рівень пошкоджень ДНК клітин та їх репарації досліджували методом електрофорезу одиничних клітин у гелі агарози (комет-аналіз ДНК) за умов лужного (Palyvoda O. et al., 2003; Singh N.P. et al., 1988) та нейтрального (Тронов В.А. и др., 1998) рН.

Статистичне опрацювання результатів проводили за допомогою комп’ютерної програми “Microsoft Excel 2002”, використовуючи критерій Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

Вплив іонізуючого випромінювання на ріст та виживання клітин лінії MCF-7. У дослідах, в яких клітини MCF-7(wt) та MCF-7(DOX/R) піддавали дії різних доз рентгенівського опромінення (1,5, 3,0 та 4,5 Гр), було встановлено дозозалежне інгібування росту клітин обох ліній на 48 год після опромінення. Щоб з’ясувати, чим зумовлене затримання зростання кількості клітин – припиненням проліферативної

активності чи їхньою загибеллю – вивчали життєздатність клітин шляхом підрахунку в цитометричній камері живих і мертвих клітин. Встановлено, що зменшення приросту кількості клітин обох ліній після опромінення зумовлене, головним чином, припиненням їхньої проліферативної активності і лише в незначній мірі (7 – 13%) – їхнім відмиранням. Порівняно з клітинами MCF-7(wt), клітини MCF-7(DOX/R) виявляли більшу стійкість до інгібування росту та цитодеструктивної дії рентгенівського опромінення. Так, культивування клітин MCF-7(wt) протягом 96 год після опромінення дозою 3,0 Гр, супроводжувалось пригніченням клітинного росту на 70%, порівняно з контролем, тоді як у клітинах MCF-7(DOX/R) за аналогічних умов спостерігалось зменшення кількості живих клітин на 45%, порівняно з контролем.

Треба зазначити, що неопромінені клітини MCF-7(DOX/R) росли повільніше, порівняно з контрольними клітинами MCF-7(wt). Тому однією з причин підвищеної стійкості клітин MCF-7(DOX/R) до дії опромінення, порівняно з клітинами MCF-7(wt), може бути повільніший час генерації та внаслідок цього збільшена здатність до репарації пошкоджень ДНК.

Вплив іонізуючого випромінювання на секрецію ТФР- β клітинами лінії MCF-7, чутливими та резистентними до дії доксорубіцину. Секрецію ТФР- β досліджували шляхом тестування його біологічної активності. Виявлено, що рівень ТФР- β у культуральному середовищі, кондиціонованому неопроміненими клітинами лінії MCF-7(DOX/R) був вищим, ніж у середовищі, кондиціонованому клітинами MCF-7(wt) і становив відповідно $0,410 \pm 0,028$ нг/мл/ 450×10^3 клітин та $0,302 \pm 0,025$ нг/мл/ 450×10^3 клітин.

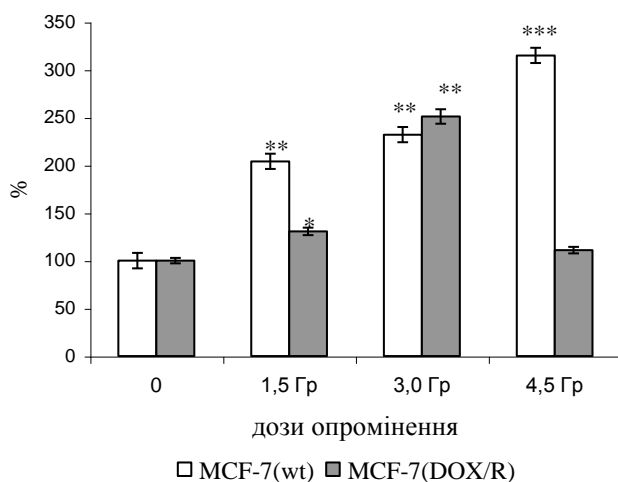


Рис. 1. Вплив рентгенівського випромінювання на секрецію ТФР- β (% від контролю) клітинами лінії MCF-7, чутливими та резистентними до дії доксорубіцину

Примітка. Тут і далі відмінність між контрольними та дослідними клітинами вірогідна (* - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$)

Встановлено зростання рівня секреції інгібіторного цитокіна ТФР- β у клітинах обох ліній на 48 год після впливу одноразового опромінення (1,5, 3,0, 4,5 Гр), причому найвищий рівень ТФР- β у культуральному середовищі, кондиціонованому клітинами MCF-7(wt), виявлено при дозі 4,5 Гр (у 3 рази більше порівняно з неопроміненими клітинами), а в клітинах MCF-7(DOX/R) – при дозі 3,0 Гр (у 2,5 рази більше порівняно з контролем) (рис. 1).

Клітини карциноми зазвичай продукують велику кількість ТФР- β , який може підсилювати інвазію пухлинних клітин та пригнічувати ріст та функціонування клітин імунної

системи (Reiss M. et al., 1997). Підвищення рівня продукції ТФР- β сприятливе для більшості злоякісних клітин лише за умови, коли такі клітини втрачають чутливість до дії цього цитокіна, тобто набувають резистентності до ТФР- β -індукованого інгібування росту та активації апоптозу (Stoika R. et al., 2003).

Вплив екстремальних чинників на експресію мРНК ТФР- β у клітинах карциноми молочної залози людини. Для дослідження експресії двох ізоформ цитокіна – ТФР- β_1 і ТФР- β_2 на рівні мРНК у клітинах лінії MCF-7, чутливих та резистентних до доксорубіцину, було використано напівкількісний метод RT-PCR. Порівняння кількості продуктів реакції, отриманих із парами праймерів, специфічних до кДНК генів ТФР- β_1 і ТФР- β_2 , та їхня нормалізація за рівнем мРНК β -актину дали змогу встановити, що в інтактних клітинах MCF-7(DOX/R) рівень мРНК ТФР- β_1 і ТФР- β_2 був вищим, порівняно з клітинами MCF-7(wt) (рис. 2).

Вплив одноразового рентгенівського опромінення (1,5, 3,0, 4,5 Гр) призводив до зростання експресії ТФР- β_1 на рівні мРНК в обох досліджуваних лініях ракових клітин, причому у клітинах MCF-7(wt) спостерігалось дозозалежне зростання рівня ТФР- β_1 , тоді як у клітинах MCF-7(DOX/R) найвищий рівень даної ізоформи цитокіну було зафіксовано після опромінення дозою 1,5 Гр (рис. 2).

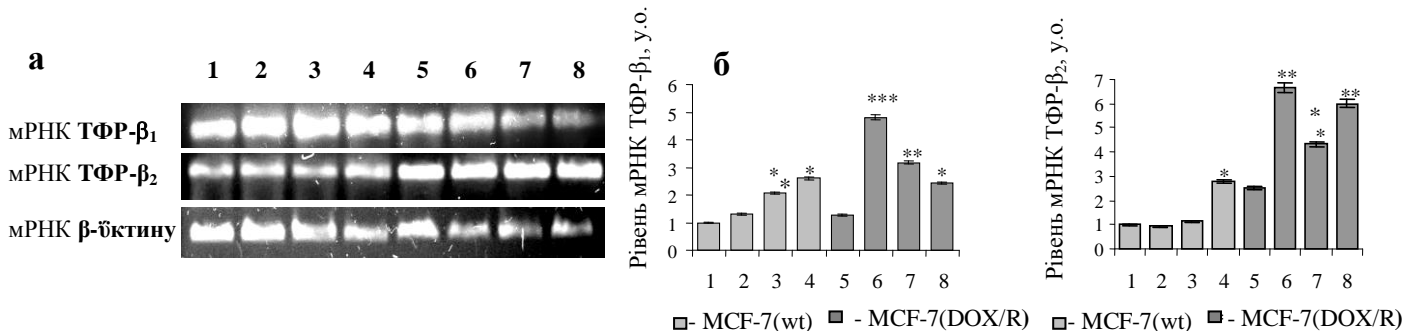


Рис. 2. Результати RT-PCR аналізу із використанням праймерів, специфічних до кДНК генів ТФР- β_1 , ТФР- β_2 і β -актину (**а**). Денситометричне вимірювання мРНК ТФР- β_1 та ТФР- β_2 , нормалізованих за рівнем мРНК β -актину (**б**) у клітинах MCF-7(wt) (1 – 4) та MCF-7(DOX/R) (5 – 8):

1, 5 – контрольні клітини, **2, 6** – клітини, опромінені дозою 1,5 Гр,
3, 7 – клітини, опромінені дозою 3,0 Гр, **4, 8** – клітини, опромінені дозою 4,5 Гр.

Виявлено зростання експресії ТФР- β_2 на рівні мРНК у клітинах MCF-7(DOX/R) під дією іонізуючого випромінювання (1,5, 3,0, 4,5 Гр), у той час як у батьківських клітинах цієї лінії лише опромінення дозою 4,5 Гр викликало достовірні зміни у кількості мРНК ТФР- β_2 (рис. 2).

Досліджено взаємозв'язок між дією протипухлинних препаратів (доксорубіцину, метотрексату, цисплатину) та експресією ТФР- β_1 та ТФР- β_2 на рівні мРНК. Показано, що під дією доксорубіцину (5 мкг/мл) не відбувається суттєвого зростання мРНК ТФР- β_1 у клітинах обох ліній, а рівень мРНК ТФР- β_2 зменшується у 1,4 та 2,3 раза під час дії цього препарату на клітини MCF-7(wt) і MCF-7(DOX/R), відповідно. Протипухлинний препарат метотрексат (25 мкг/мл) індукував зниження в 1,3 раза експресії ТФР- β_1 на рівні мРНК у клітинах MCF-7(DOX/R). Обробка клітин

цисплатином (10 мкг/мл) не призводила до змін рівня мРНК ТФР- β_1 у клітинах обох ліній. Виявлено зростання мРНК ТФР- β_2 у клітинах MCF-7(wt) під впливом метотрексату та у клітинах MCF-7(DOX/R) – під впливом метотрексату та цисплатину.

Вплив рентгенівського випромінювання на сигнальний шлях ТФР- β у клітинах лінії MCF-7 з різною чутливістю до дії доксорубіцину. Після виявлення зростання продукції ТФР- β у досліджуваних клітинах під впливом іонізуючої радіації, було доцільно дослідити експресію компонентів сигнального шляху цього цитокіна в опромінених клітинах. Відомо, що взаємодія ТФР- β зі специфічним клітинним рецептором Т β RII, який є конститутивно активною протеїнкіназою, призводить до фосфорилування та активації рецептора Т β RI. Для дослідження експресії рецепторів ТФР- β I та II типу на рівні мРНК, із клітин ліній MCF-7(wt) та MCF-7(DOX/R) після впливу на них одноразового рентгенівського опромінення (1,5, 3,0, 4,5 Гр), було виділено сумарну РНК і проаналізовано її за допомогою напівкількісного методу RT-PCR. Показано, що клітини лінії MCF-7 з різною чутливістю до дії доксорубіцину відрізняються за рівнем мРНК рецепторів Т β RI³ Т β RI². Так, у неопромінених клітинах MCF-7(DOX/R) рівень мРНК Т β RI³ Т β RI² був вищим, ніж у інтактних клітинах MCF-7(wt) (рис. 3).

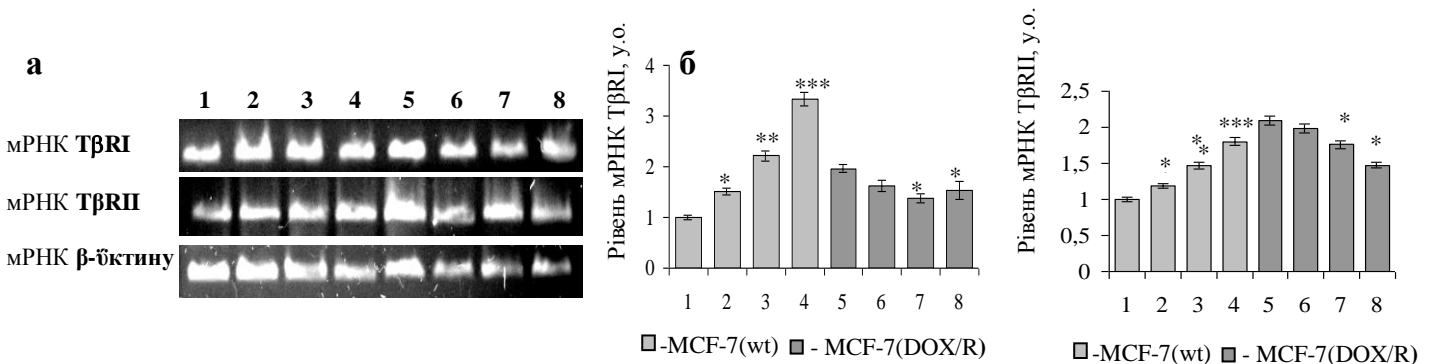


Рис. 3. Результати RT-PCR аналізу із використанням праймерів, специфічних до кДНК генів рецепторів ТФР- β типу I (Т β RI), типу II (Т β RII) і β -актину (а). Денситометричне вимірювання мРНК Т β RI і Т β RII, нормалізованих за рівнем мРНК β -актину (б) у клітинах MCF-7(wt) (1 – 4) та MCF-7(DOX/R) (5 – 8):

1, 5 – контрольні клітини, 2, 6 – клітини, опромінені дозою 1,5 Гр,
3, 7 – клітини, опромінені дозою 3,0 Гр, 4, 8 – клітини, опромінені дозою 4,5 Гр.

Виявлено дозозалежне зростання рівня мРНК Т β RI³ Т β RI² у клітинах лінії MCF-7(wt), тоді як в опромінених (3,0, 4,5 Гр) клітинах сублінії MCF-7(DOX/R) спостерігалось зниження експресії Т β RI і Т β RII на рівні мРНК. Під дією іонізуючого випромінювання дозою 1,5 Гр у клітинах MCF-7(DOX/R) рівень мРНК Т β RI³ Т β RI² суттєво не змінювався, порівняно з контролем (рис. 3).

Наведені результати показали, що під впливом рентгенівського випромінювання може відбуватись інгібування передавання сигналу ТФР- β у клітинах лінії MCF-7(DOX/R) внаслідок порушення відповідного сигнального шляху на різних рівнях, зокрема, шляхом зниження експресії рецепторів ТФР- β .

Від поверхневих рецепторів ТФР- β до ядра клітини-мішені сигнал передається за допомогою білків Smad. Білки Smad2 і Smad3 безпосередньо взаємодіють з активованими рецепторами та фосфорилуються ними. Білок Smad4 взаємодіє з фосфорильованими білками Smad2 і Smad3, утворюючи комплекс, який переноситься в ядро, де бере участь в активації транскрипції. Білки Smad6 і Smad7 виконують функцію інгібіторів регуляторного сигналу ТФР- β у клітині (Derynck R. et al., 2001; Moustakas A. et al., 2001; Shi Y. et al., 2003; ten Dijke P. et al., 2004).

Методом імуноблот-аналізу показано, що у клітинах лінії MCF-7(wt) відбувається зростання рівня експресії білка Smad2, а також фосфорильованої форми цього білка (Smad2P) при дії рентгенівського опромінення дозою 1,5 Гр, тоді як у разі вищих доз радіації (3,0 Гр, 4,5 Гр) не виявлено статистично достовірних змін експресії цих білків. У резистентних до дії доксорубіцину клітинах лінії MCF-7 рівень білка Smad2 і Smad2P не змінювався під впливом опромінення, порівняно з контрольними клітинами. Встановлено відсутність експресії білка Smad3 у клітинах MCF-7(wt), у той час як цей білок добре виявляється у лізатах клітин сублінії MCF-7(DOX/R). Ми не виявили відмінностей в експресії білків Smad4 та Smad7 під впливом опромінення у чутливих до доксорубіцину клітинах MCF-7(wt) та в резистентних до цього препарату клітинах MCF-7(DOX/R).

Підсумовуючи, треба зазначити, що пухлинні клітини володіють високим адаптаційним потенціалом. Хоча різні стресові чинники, зокрема рентгенівське випромінювання, викликають зростання рівня секреції ТФР- β у клітинах багатьох злоякісних пухлин, вони також індукують зміни у регуляторній системі даного цитокіна, впливаючи на специфічні рецептори цього цитокіна та пост-рецепторні сигнальні механізми.

Вплив протипухлинних препаратів на сигнальний шлях ТФР- β у клітинах лінії MCF-7 з різною чутливістю до дії доксорубіцину. Для дослідження експресії рецепторів ТФР- β I та II типу на рівні мРНК, клітини ліній MCF-7(wt) та MCF-7(DOX/R) інкубували протягом 24 год у присутності протипухлинних препаратів (доксорубіцину, метотрексату, цисплатину), після чого було виділено сумарну РНК і проаналізовано її за допомогою напівкількісного методу RT-PCR.

Виявлено зростання у 2 рази рівня мРНК рецептора T β RI σ клітинах лінії MCF-7(wt) під впливом цисплатину (10 нг/мл). Обробка цих клітин доксорубіцином (5 мкг/мл) та метотрексатом (25 мкг/мл) не призводила до змін експресії T β RI на рівні мРНК. Дія доксорубіцину та метотрексату на клітини лінії MCF-7(DOX/R) викликала зниження рівня мРНК T β RI у 2 та 1,4 раза, відповідно. Дія досліджуваних протипухлинних препаратів супроводжувалась зниженням експресії мРНК рецептора T β RI² у клітинах обох ліній, причому найбільший вплив на клітини MCF-7(wt) виявляв цисплатин, а на клітини MCF-7(DOX/R) – доксорубіцин.

За допомогою імуноблот-аналізу виявлено індукцію експресії білка Smad2 та фосфорильованої форми цього білка у клітинах лінії MCF-7(wt) під дією метотрексату (25 мкг/мл) та доксорубіцину (5 мкг/мл). У клітинах сублінії

MCF-7(DOX/R) рівень білка Smad2 підвищувався після інкубації клітин протягом 24 год у середовищі, яке містило доксорубіцин (5 мкг/мл) та цисплатин (10 мкг/мл). У той же час рівень фосфорильованого Smad2 був низьким і залишався незмінним у клітин MCF-7(DOX/R) за даних експериментальних умов. Дія ТФР- β σ концентрації 5 нг/мл призводила до індукції експресії активної фосфорильованої форми білка Smad2 у чутливих до дії доксорубіцину клітинах лінії MCF-7(wt).

Ми не виявили статистично достовірних відмінностей в експресії білка Smad4 у клітинах обох ліній, а також білка Smad3 у клітинах MCF-7(DOX/R). Рівень експресії інгібіторного білка Smad7 підвищувався у клітинах лінії MCF-7(wt) під впливом метотрексату (25 мкг/мл), а також у клітинах MCF-7(DOX/R) під впливом доксорубіцину (5 мкг/мл).

Вплив рентгенівського випромінювання та протипухлинних препаратів на експресію про- та антиапоптичних білків у клітинах лінії MCF-7 з різною чутливістю до дії доксорубіцину. Методом імуноблот-аналізу білків лізатів клітин лінії MCF-7(wt) та сублінії MCF-7(DOX/R) встановлено, що рівень експресії білка p53 є вищим у неопромінених клітинах MCF-7(DOX/R), ніж у батьківських клітинах цієї лінії (рис. 4). Відомо, що білок p53 може або опосередковувати, або захищати

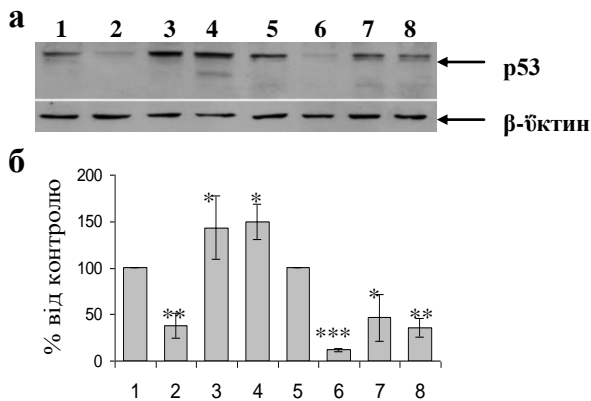


Рис. 4. Експресія білка p53 у клітинах ліній MCF-7 (wt) (1–4) та MCF-7 (DOX/R) (5–8) під впливом рентгенівського випромінювання (а). Денситометричний аналіз електрофореграм із нормалізацією кількості білка за β -актином (% від контролю, контроль прийнято за 100%) (б).

1, 5 – контроль, 2, 6 – 1,5 Гр,
3, 7 – 3,0 Гр, 4, 8 – 4,5 Гр.

опромінення (3,0, 4,5 Гр) рівень p53 залишався нижчим, порівняно з контрольними клітинами даної сублінії (рис. 4).

Взаємодія між провідними регуляторами апоптозу, зокрема білками родини Bcl-2 і p53, може спрямовувати клітину в напрямі виживання або загибелі після пошкодження ДНК. Методом імуноблот-аналізу, у якому використовували поліклональні кролячі анти-Bcl-2 антитіла, виявлено дві електрофоретичні смуги білка Bcl-2, одна з яких мігрувала на рівні білка з М.м. 26 кДа, а інша – на 30 кДа (рис.

клітини від апоптозу, залежно від того, чи цей білок дикого типу, чи мутантний. Мутантна форма білка p53 є стабільнішою, ніж p53 дикого типу, і клітини з високими рівнями p53 зазвичай експресують мутовані, або інактивовані форми цього білка (del Bufalo D. et al., 1996). Рівень експресії білка p53 зменшувався у клітинах обох ліній при рентгенівському опроміненні дозою 1,5 Гр, тоді як при опроміненні дозами 3,0 та 4,5 Гр зростання рівня експресії цього білка, порівняно з неопроміненими клітинами, виявлено у клітинах MCF-7(wt). У клітинах MCF-7(DOX/R) після

5). Встановлено, що рівень експресії Bcl-2 зменшувався на 22% та 17% у клітинах лінії MCF-7(wt) 48 год після дії рентгенівського випромінювання дозою 3,0 і 4,5 Гр, відповідно, у той час як у клітинах MCF-7(DOX/R) за аналогічних умов не спостерігалось статистично достовірних змін у експресії форм білка з М.м. 26 та 30 кДа (рис. 5).

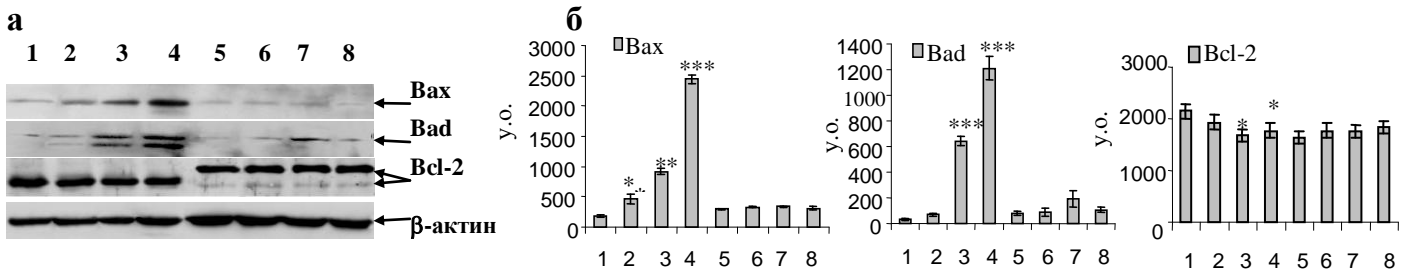


Рис. 5. Експресія білків Bax, Bad та Bcl-2 у клітинах ліній MCF-7 (wt) (1–4) та MCF-7 (DOX/R) (5–8) під впливом рентгенівського випромінювання (а). Денситометричний аналіз електрофореграм із нормалізацією кількості білка за β -актином (б).

1, 5 – контроль, 2, 6 – 1,5 Гр, 3, 7 – 3,0 Гр, 4, 8 – 4,5 Гр

Результати імуноблот-аналізу показали, що після дії рентгенівського випромінювання (1,5–4,5 Гр), мало місце дозозалежне зростання експресії проапоптичних білків Bax і Bad у клітинах MCF-7(wt). У резистентних до дії доксорубіцину клітинах не виявлено статистично достовірних змін в експресії цих білків після впливу радіації (рис. 5).

Інкубація клітин MCF-7(wt) протягом 24 год у середовищі, що містило метотрексат (25 мкг/мл), доксорубіцин (5 мкг/мл) чи цисплатин (10 мкг/мл) призводило до зниження експресії Bcl-2, порівняно з інтактними клітинами у 1,4, 3,6 та 4,6 раза, відповідно. Культивування клітин MCF-7(DOX/R) за аналогічних умов у присутності метотрексату, доксорубіцину чи цисплатину призводило до зростання експресії форми Bcl-2 30 кДа (у 1,25, 2,0 та 1,7 раза, відповідно) порівняно з контрольними клітинами даної лінії. Встановлено зростання експресії проапоптичного білка Bad у препаратах як батьківських, так і резистентних до дії доксорубіцину клітин лінії MCF-7, оброблених доксорубіцином та цисплатином, тоді як метотрексат не викликав суттєвого збільшення рівня експресії цього білка в досліджуваних клітинах.

Дослідження індукованих радіацією пошкоджень ДНК та їхньої репарації у клітинах карциноми молочної залози лінії MCF-7. Для визначення рівня початкових та залишкових пошкоджень ДНК, викликаних дією рентгенівського випромінювання та швидкості репарації цих пошкоджень у клітинах ліній MCF-7(wt) та MCF-7(DOX/R), було застосовано комет-аналіз за умов лужного рН. На цьому етапі досліджень як позитивний контроль додатково було використано клітини лейкемії людини лінії K562, оскільки з літературних джерел (Fertil V. et al., 1985) відомо, що пухлини, які походять з лімфоїдних клітин (лімфоми, міеломи, лейкемії) є високочутливими до дії радіації.

У клітинах MCF-7(wt), які тестували відразу (на 0 хв) після опромінення дозою 2,0 Гр виявлено вищий рівень пошкоджень ДНК (в 1,75 раза) порівняно з клітинами MCF-7(DOX/R) за аналогічних умов. Повну репарацію пошкоджень ДНК у клітинах MCF-7(wt) спостерігали через 180 хв після опромінення, тоді як у клітинах лінії K562 залишкові нерепаровані пошкодження (~30%) були виявлені навіть після 180 хв культивування цих клітин. Клітини лінії MCF-7(DOX/R) відносно швидко репарували розриви ДНК. Так, вже після 30 хв культивування не було виявлено статистично достовірних відмінностей у рівнях міграції ДНК між контрольними та опроміненими клітинами цієї лінії.

Загалом, результати наших досліджень, вказують на те, що у пухлинній клітині, на яку діють рентгенівське випромінювання чи ДНК-пошкоджуючі протипухлинні препарати, запускаються захисні механізми, покликані зупинити розвиток пошкодження, викликаного цими стресовими чинниками. Індукція експресії ТФР- β може синергічно підсилювати летальну дію протипухлинних агентів, впливаючи опосередковано, через індукцію апоптичних процесів (Raynal S. et al., 1997), або безпосередньо знижувати рівень експресії білка Rad51, який бере участь у процесах репарації ДНК (Kanamoto T. et al., 2002). Тому інгібування передавання регуляторного сигналу ТФР- β може сприяти розвитку стійкості ракових клітин до дії стресових чинників.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення та отримано нові дані стосовно впливу рентгенівського випромінювання та протипухлинних препаратів (доксорубіцину, метотрексату, цисплатину) на клітини лінії MCF-7 (wt – батьківська лінія) карциноми молочної залози людини та ці клітини сублінії MCF-7(DOX/R) з підвищеною резистентністю до дії доксорубіцину. Отримані результати вказують на існування зв'язку між змінами у функціонуванні регуляторної системи трансформуючого фактора росту β (ТФР- β) та виникненням перехресної стійкості клітин лінії MCF-7 карциноми молочної залози людини до дії доксорубіцину та радіації. Показано, що у клітинах сублінії MCF-7(DOX/R) індуковані рентгенівським опроміненням зміни у сигнальному шляху ТФР- β можуть призводити до порушення передавання регуляторного сигналу цього цитокіна.

1. Клітини сублінії MCF-7(DOX/R) карциноми молочної залози людини характеризуються підвищеною стійкістю до ріст-інгібувальної дії рентгенівського випромінювання порівняно з клітинами лінії MCF-7(wt).

2. У клітинах сублінії MCF-7(DOX/R), порівняно з клітинами MCF-7(wt), має місце підвищена експресія ТФР- β на рівні мРНК та підвищена продукція даного цитокіна на рівні білка. Рентгенівське випромінювання індукує зростання рівня мРНК ТФР- β та секреції цього цитокіна у клітинах обох ліній. Найвищий рівень ТФР- β у кондиціонованому середовищі від клітин MCF-7(wt) виявлено після опромінення дозою 4,5 Гр (у 3 рази більше порівняно з неопроміненими клітинами), а

в клітинах MCF-7(DOX/R) – при 3,0 Гр (у 2,5 раза більше порівняно з контролем). Отримані дані вказують на потенційну роль ТФР- β як посередника у дії рентгенівського опромінення на клітини лінії MCF-7 карциноми молочної залози людини.

3. Рівень мРНК ТФР- β_1 у клітинах ліній MCF-7(wt) та MCF-7(DOX/R) не змінюється під впливом доксорубіцину (5 мкг/мл), тоді як рівень мРНК ТФР- β_2 інгібується у 1,4 та 2,3 раза під впливом цього препарату на клітини MCF-7(wt) і MCF-7(DOX/R), відповідно.

4. Клітини лінії MCF-7, резистентні до дії доксорубіцину, мають змінену, порівняно з чутливими до цього препарату клітинами, експресію компонентів сигнального шляху ТФР- β . Рівень мРНК рецепторів ТФР- β I та II типів у клітинах сублінії MCF-7(DOX/R) є вищим, ніж у клітинах лінії MCF-7(wt). Дія рентгенівського випромінювання (1,5, 3,0, 4,5 Гр) призводить до дозозалежного зростання рівня мРНК рецепторів ТФР- β I і II типів у клітинах лінії MCF-7(wt), тоді як у клітинах сублінії MCF-7(DOX/R) рівень мРНК рецепторів ТФР- β I і II типів знижується після опромінення дозою 3,0 і 4,5 Гр.

5. Протипухлинний препарат цисплатин (10 мкг/мл) індукує зростання у 2 рази експресії рецептора ТФР- β I типу у клітинах лінії MCF-7(wt). У клітинах сублінії MCF-7(DOX/R) експресія рецептора ТФР- β I типу на рівні мРНК інгібується у 2 рази доксорубіцином (5 мкг/мл) та у 1,4 раза метотрексатом (25 мкг/мл). Рівень мРНК рецептора II типу ТФР- β знижується у клітинах обох ліній під впливом кожного з досліджуваних препаратів – доксорубіцину, метотрексату чи цисплатину.

6. У чутливих до доксорубіцину клітинах MCF-7(wt) не виявлено експресії сигнального білка Smad3, тоді як цей білок добре експресується у клітинах MCF-7(DOX/R). Опромінення дозою 1,5 Гр клітин лінії MCF-7(wt) індукує зростання рівня експресії сигнального білка Smad2 та його фосфорильованої форми.

7. Доксорубіцин (5 мкг/мл) та метотрексат (25 мкг/мл) індукують зростання рівня експресії сигнального білка Smad2 та його фосфорильованої форми у клітинах лінії MCF-7(wt). Показано підвищення рівня експресії інгібіторного білка Smad7 у клітинах MCF-7(wt) під дією метотрексату та у клітинах MCF-7(DOX/R) під дією доксорубіцину.

8. Виявлено відмінності в електрофоретичній рухливості білка Bcl-2 між чутливими та резистентними до доксорубіцину клітинами лінії MCF-7. Встановлено, що порівняно з клітинами MCF-7(DOX/R), у клітинах MCF-7(wt) під дією рентгенівського випромінювання та досліджуваних протипухлинних препаратів інгібується експресія антиапоптичного білка Bcl-2. Рівень експресії проапоптичних білків p53, Вах, Bad зростає в опромінених клітинах лінії MCF-7(wt).

9. Виявлено нижчий рівень індукції пошкоджень ДНК під впливом рентгенівського випромінювання та швидшу репарацію цих пошкоджень у резистентних до доксорубіцину клітинах лінії MCF-7.

ОСНОВНІ ПУБЛІКАЦІЇ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Comparative study of human breast carcinoma MCF-7 cells differing in their resistance to doxorubicin: effect of ionizing radiation on apoptosis and TGF- β production / I. Chorna, R. Bilyy, L. Datsyuk, R. Stoika // Экспериментальная онкология. – 2004. – Т. 26, № 2. – С. 111-117. *(Дисертанту належить визначення впливу опромінення на ріст, загибель, секрецію ТФР- β пухлинними клітинами, проведення електрофорезу білків та імуноблот-аналізу експресії білка p53, статистичне опрацювання результатів, пошук літератури, аналіз отриманих даних та написання статті).*

2. Chorna I., Datsyuk L., Stoika R. Expression of Bcl-2 protein in breast cancer cells sensitive and resistant to doxorubicin: modulation by X-radiation and chemotherapeutic drugs // Экспериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2005. – Т. 2, № 30. – С. 7-13. *(Дисертанту належить підготовка зразків для дослідів, проведення електрофорезу білків та імуноблот-аналізу експресії білка Bcl-2, статистичне опрацювання результатів, аналіз отриманих даних та написання статті).*

3. Expression of mRNA coding for TGF- β and its receptors in irradiated human breast carcinoma MCF-7 cells differing in their sensitivity to doxorubicin / I. Chorna, O. Fedorenko, L. Datsyuk, R. Stoika // Экспериментальная онкология. – 2005. – Т. 27, № 2. – С. 156-158. *(Дисертанту належить підготовка зразків для роботи з мРНК ТФР- β_1 та ТФР- β_2 , рецепторів ТФР- β I і II типу, статистичне опрацювання результатів, пошук літератури, аналіз отриманих даних та написання статті).*

4. Chorna I.V., Datsyuk L.O., Stoika R.S. Expression of Bax, Bad and Bcl-2 proteins under X-radiation effect towards human breast carcinoma MCF-7 cells and their doxorubicin-resistant derivatives // Экспериментальная онкология. – 2005. – Т. 27, № 3. – С. 196-201. *(Дисертанту належить підготовка зразків для дослідів, проведення електрофорезу білків та імуноблот-аналізу експресії білків Bax, Bad та Bcl-2 у клітинах лінії MCF-7 після впливу на них радіації та хіміопрепаратів, визначення рівня пошкоджень ДНК клітин методом ДНК-комет, статистичне опрацювання результатів, пошук літератури, аналіз отриманих даних та написання статті).*

5. Дослідження ролі трансформуючого фактора росту β_1 у механізмах резистентності злоякісних клітин до протипухлинних препаратів / Р.С. Стойка, Є.З. Філяк, О.С. Філяк, І.В. Чорна, О.В. Федоренко // Фундаментальні орієнтири науки. Біологія та науки про Землю і навколишнє середовище. – К.: Академперіодика, 2005. – С. 36-47. *(Дисертанту належить підготовка зразків для роботи з мРНК ТФР- β_1 , ТФР- β_2 та рецепторів ТФР- β I і II типу, участь в аналізі експериментальних даних).*

6. Чорна І.В., Дацюк Л.О., Стойка Р.С. Вплив рентгенівського випромінювання на клітини лінії MCF-7 раку молочної залози людини з різною чутливістю до доксорубіцину // Шоста конференція молодих онкологів України “Сучасні проблеми експериментальної та клінічної онкології”. – Київ, 2003. – С. 65. *(Дисертанту належить отримання результатів досліджень, статистичне опрацювання та аналіз експериментальних даних, написання та оформлення тез).*

7. Chorna I.V., Datsyuk L.O., Stoika R.S. The effect of ionizing radiation on human breast carcinoma MCF-7 cells differing in their sensitivity to doxorubicin // Abstr. First (Inaugural) Ukrainian Congress for Cell Biology. – Lviv, 2004. – P. 133. *(Дисертант провела експериментальні дослідження, статистично опрацювала результати, проаналізувала отримані дані, підготувала матеріал до друку).*

8. Transforming growth factor beta in cell response to stressing actions / R.S. Stoika, I.A. Yakymovych, M.Ya. Yakymovych, O.G. Korchynsky, Ye.Z. Filyak, O.S. Filyak, I.V. Chorna // Abstr. First (Inaugural) Ukrainian Congress for Cell Biology. – Lviv, 2004. – P. 340. *(Дисертант провела визначення продукції ТФР- β раковими клітинами під дією іонізуючого випромінювання, статистично опрацювала результати).*

9. Chorna I., Datsyuk L., Stoika R. Effect of some anticancer drugs and X-irradiation on expression of Smad proteins in human breast carcinoma MCF-7 cells differing in their resistance to doxorubicin // 5th Parnas Conference “Molecular mechanisms of cellular signaling”. – Київ. – Український біохімічний журнал (Спеціальний випуск). – 2005. – Т. 77, № 2. – С. 165. *(Дисертант провела експериментальні дослідження, статистично опрацювала результати, підготувала тези до друку).*

10. Interrelations between the action of specific anticancer drugs and transforming growth factor β / R. Stoika, Y. Filyak, O. Filyak, I. Chorna, O. Fedorenko, S. Souchelnytskyi // 40th Meeting of the Polish Biochemical Society. – Lublin (Poland). – Acta Biochimica Polonica. – 2005. – Vol. 52, № 1. – P. 126-127. *(Дисертант визначила вплив хіміопрепаратів та радіації на експресію мРНК ТФР- β_1 , ТФР- β_2 , рецепторів ТФР- β I і II типу в клітинах лінії MCF-7, статистично опрацювала результати).*

11. Analysis of heterogeneity of K562 sub-clones selected under exposure to ionizing radiation / J. Łanuszewska, M. Pietrowska, K. Szołtysek, I. Chorna, P. Widłak // 40th Meeting of the Polish Biochemical Society. – Lublin (Poland). – Acta Biochimica Polonica. – 2005. – Vol. 52, № 1. – P. 179. *(Дисертант визначила методом комет-аналізу рівень індукованих радіацією пошкоджень ДНК у суб-клонах клітин лінії K562, статистично опрацювала результати).*

АНОТАЦІЯ

Чорна І.В. Вплив іонізуючого випромінювання та протипухлинних препаратів на регуляторну систему трансформуючого фактора росту бета у клітинах карциноми молочної залози з різною резистентністю до доксорубіцину. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія, Інститут біології тварин УААН, Львів, 2006.

Дисертація присвячена дослідженню впливу рентгенівського випромінювання та протипухлинних препаратів (доксорубіцин, метотрексат, цисплатин) на експресію окремих компонентів сигнального шляху трансформуючого фактора росту бета (ТФР- β) у клітинах лінії MCF-7 карциноми молочної залози людини, чутливих (wt) та резистентних (DOX/R) до дії доксорубіцину. Встановлено, що розвиток

резистентності клітин лінії MCF-7 до доксорубіцину супроводжується втратою їхньої чутливості до ріст-інгібуючої дії та індукції апоптозу під впливом рентгенівського випромінювання. Показано, що в обох досліджуваних лініях клітин під впливом опромінення відбувається зростання експресії ТФР- β на рівні мРНК, а також підвищується секреція цього цитокіна, який здатний інгібувати ріст та індукувати апоптоз клітин епітеліального походження. Розвиток стійкості клітин лінії MCF-7(DOX/R) до дії радіації може бути, принаймні частково, спричинений порушеннями у сигнальній системі ТФР- β , про що свідчить зниження експресії рецепторів ТФР- β I та II типу у клітинах MCF-7(DOX/R) під дією рентгенівського випромінювання.

Ключові слова: клітини лінії MCF-7 карциноми молочної залози людини, трансформуючий фактор росту β , стійкість до доксорубіцину, апоптоз, рентгенівське випромінювання.

АННОТАЦІЯ

Черная И.В. Влияние ионизирующего излучения и противоопухолевых препаратов на регуляторную систему трансформирующего фактора роста бета в клетках карциномы молочной железы с разной устойчивостью к доксорубицину. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 – биохимия, Институт биологии животных УААН, Львов, 2006.

Диссертация посвящена исследованию влияния рентгеновского излучения и противоопухолевых препаратов (доксорубицин, метотрексат, цисплатин) на экспрессию отдельных компонентов сигнального пути трансформирующего фактора роста бета (ТФР- β) в клетках линии MCF-7 карциномы молочной железы человека, чувствительных (wt) и резистентных (DOX/R) к действию доксорубицина. Установлено, что развитие устойчивости клеток линии MCF-7 к доксорубицину сопровождается потерей их чувствительности к ингибированию роста и индукции апоптоза под влиянием рентгеновского излучения. Показано, что действие облучения вызывало повышение экспрессии ТФР- β на уровне мРНК в исследуемых линиях клеток, а также повышение секреции данного цитокіна, способного ингибировать рост и индуцировать апоптоз клеток эпителиального происхождения. Развитие устойчивости клеток линии MCF-7(DOX/R) к влиянию радиации может быть, по крайней мере частично, вызвано нарушениями в сигнальной системе ТФР- β , о чем свидетельствует снижение экспрессии рецепторов ТФР- β I и II типа в клетках MCF-7(DOX/R) под влиянием рентгеновского излучения.

Ключевые слова: клетки линии MCF-7 карциномы молочной железы человека, трансформирующий фактор роста β , устойчивость к доксорубицину, апоптоз, рентгеновское облучение.

SUMMARY

Chorna I.V. Effect of ionizing radiation and anticancer drugs on regulatory system of transforming growth factor beta in breast carcinoma cells differing in their resistance to doxorubicin. – Manuscript.

Thesis for Ph.D. science degree in the field of biological sciences in speciality 03.00.04 – biochemistry, Institute of Animal Biology UAAS, Lviv, 2006.

Dissertation is devoted to the study of the effect of X-radiation and anticancer drugs (doxorubicin, methotrexate, cisplatin) on expression of components of the transforming growth factor β (TGF- β) signaling system in human breast carcinoma MCF-7 cells, sensitive (wt) and resistant (DOX/R) to the action of anticancer drug doxorubicin. It was found that the development of refractoriness to doxorubicin in MCF-7 cells was accompanied by loss of their sensitivity to X-radiation-dependent growth inhibition and apoptosis induction. X-radiation (3.0, 4.5 Gy) increased expression of pro-apoptotic p53, Bax and Bad proteins and decreased expression of Bcl-2 protein in MCF-7(wt) cells, but not in cells of MCF-7(DOX/R) subline. Different pattern of Bcl-2 expression was shown in MCF-7(DOX/R) cells comparing with MCF-7(wt) cells. A decreased level of X-radiation-induced DNA damage and an increased DNA repair capacity were revealed in MCF-7(DOX/R) cells comparing with MCF-7(wt) cells.

Semiquantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis was used to measure the expression of mRNA coding for TGF- β and its receptors in MCF-7(wt) cells in comparison with MCF-7(DOX/R) cells. The levels of T β RI and T β RII mRNA were higher in the intact MCF-7(DOX/R) cells than in the intact unirradiated MCF-7(wt) cells. It was shown that X-irradiation caused an increase in expression of mRNA coding for TGF- β and an elevation of secretion of that cytokine in both breast cancer cell lines tested. TGF- β is a polyfunctional cytokine which inhibits growth and induces apoptosis in cells of epithelial origin. Taking into account that TGF- β is a potent natural immunosuppressor, the elevated activity of this cytokine can intensify negative effects of X-rays. The observation that the induction of TGF- β_1 and TGF- β_2 mRNAs expression was accompanied by a decreased T β RI and T β RII mRNAs expression in the irradiated MCF-7(DOX/R) cells suggested that the refractoriness of MCF-7(DOX/R) cells to X-rays could be, at least partly, explained by a the impairment in TGF- β signaling pathway.

It was shown that anticancer drug doxorubicin (5 μ g/ml) did not change the level of mRNA coding for TGF- β_1 in cells of both sublines, whereas the level of mRNA coding for TGF- β_2 was inhibited after doxorubicin action on both breast cancer cell lines tested. The expression of mRNA coding for TGF- β receptor type II was decreased in MCF-7(wt) and MCF-7(DOX/R) cells upon treatment with studied anticancer drugs.

Thus, tumor cells possess a high adaptation potential and difference in effects of chemotherapeutic drugs and X-rays on MCF-7 (wt) compared with MCF-7 (DOX/R) cells can be, at least partly, mediated by alterations in TGF- β regulatory system via impairing TGF- β receptor and post-receptor signaling mechanisms.

Key words: MCF-7 human breast carcinoma cells, transforming growth factor β , doxorubicin resistance, apoptosis, X-radiation.

Підписано до друку 27.04.2006р.
Формат 60х90х16. Папір офсетний.
Друк офсетний. Умовн. друк. арк. 1,0. Зам. № 85.
Наклад 100 примірників

Роздруковано в ПП “Арал”

м. Львів, вул. Нижанківського, 4