

5. М а л а ш е в и ч А. В., К а х н о в и ч Л. В. // Вестн. Белорус. ун-та. Сер. 2: Хим. Биол. Геогр. 1986. № 3. С. 40.
6. Ш л ы к А. А., М и х а й л о в а С. А. // Докл. АН СССР. 1973.
7. М о л о т к о в с к и й Ю. Г. // Физиол. растений. 1970. Т. 17. № 6.
8. Ш л ы к А. А., М а л а ш е в и ч А. В. // Докл. АН СССР. 1970. Т. 194. № 3.
9. К о н е в С. В., А к с е н ц е в С. Л., Ч е р н и ц к и й Е. А. Конформационно-кооперативные переходы белков в клетке. Мн., 1970.
10. М а л а ш е в и ч А. В. Влияние трипсина на состояние и метаболизм хлорофиллов *a* и *b* // IV науч. конф. молодых ученых: Тез. докл. Мн., 1970. С. 60.

УДК 616-006; 612.015.348

В. В. СЕНЧУК, Л. А. ЛАСТОВСКАЯ

СОСТОЯНИЕ ЦИТОСКЕЛЕТНЫХ БЕЛКОВ В ПРОЦЕССЕ РОСТА ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ

The study of actin and tubulin polymerization state, and their distribution within several cancer cells during the process of tumour progression showed the significant rearrangements of the cellular distribution of the cytoskeleton components and marked alteration of their organization pattern.

В исследовании биохимических особенностей злокачественных клеток важное значение придается изучению структурно-функционального состояния компонентов цитоскелета, в значительной степени определяющего протекание различных клеточных процессов — деления, формообразования, рецепции, секреции и др. [1, 2]. В настоящее время установлено, что нарушение организации цитоскелета является одним из характерных признаков злокачественных клеток [1]. В основе этого явления лежит изменение экспрессии изоформ актина [2] и появление в злокачественных клетках мутантных изоформ актина [3, 4]. Причиной обнаруживаемого в опухолях даже одинаковой локализации и гистогенеза многообразия нарушений экспрессии изоформ различных белков является высокий уровень генетической нестабильности опухолевых клеток, проявляющийся в прогрессии неоплазм [5]. Вместе с тем структурно-функциональное состояние цитоскелетных белков в процессе прогрессии злокачественных опухолей до настоящего времени не изучено.

Целью настоящей работы явилось исследование структурного состояния белков цитоскелета (тубулина, глобулярного актина (Г-актина), фибриллярного актина (Ф-актина)) в процессе роста перевиваемых злокачественных опухолей крыс различного гистогенеза, скорости роста и степени злокачественности.

Материал и методика

Эксперименты проведены на беспородных белых крысах массой 150—180 г, содержащихся на стандартном рационе вивария. В работе использовали перевиваемые злокачественные опухоли крыс саркома-45 и карциносаркома Уокера 256, полученные из коллекции штаммов злокачественных опухолей Института экспериментальной и клинической онкологии АМН России. Злокачественные опухоли поддерживали путем перевивания суспензии опухолевых клеток лабораторным животным в соответствии с общепринятыми методами [6]. Животных-опухоленосителей брали в опыт через определенные временные интервалы после перевивания злокачественных клеток, что обусловлено различной скоростью роста штаммов опухолей, использованных в настоящей работе [7].

Субклеточные фракции злокачественных клеток получали методом дифференциального центрифугирования [8]. Содержание Г-актина и Ф-актина измеряли в цитоплазматической фракции и в составе плазматической мембраны злокачественных клеток по степени ингибирования активности панкреатической ДНКазы 1 [4]. Суспензию изолированных клеток злокачественных опухолей получали по методу Jacob и Bhargava [9]. Жизнеспособность клеток оценивали по поглощению красителя трипанового синего [9]. Цитоскелет получали лизисом клеток в растворе, содержащем 0,5 %-й тритон X-100 [10]. Белковый состав цитоскелета и плазматических мембран опухолевых клеток анализировали электрофо-

резом в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) [11]. Белки в ПААГ окрашивали красителем кумасси R-250 [11]. Количественное определение актина и тубулина в составе цитоскелета и плазматических мембран злокачественных клеток после электрофоретического разделения в ПААГ осуществляли денситометрированием гелей на денситометре «Ultrosan». В качестве калибровочных стандартов для денситометрии использовали актин из скелетных мышц крыс, который очищали по методу Spudich и Watt [12], и очищенный тубулин из мозга быка, любезно предоставленный В. П. Курченко. Концентрацию белка определяли колориметрическим методом [13]. Экспериментальные данные обрабатывали статистически.

Результаты и их обсуждение

На рис. 1 представлены результаты электрофоретического анализа белков цитоскелетных фракций, полученных экстракцией клеток саркомы-45 и карциносаркомы Уокера 256 раствором, содержащим неионный детергент тритон X-100. Количественный денситометрический анализ электрофореграмм показывает, что актин (молекулярная масса 43 000) и тубулин (молекулярная масса 55 000) являются основными компонентами микрофиламентов и микротрубочек в составе цитоскелета и плазматических мембран злокачественных клеток так же, как это имеет место в нормальных клетках [1]. Электрофоретический профиль белков цитоскелета саркомы-45 и карциносаркомы Уокера 256 обнаруживает значительное сходство, несмотря на различный гистотип исследованных злокачественных опухолей, а некоторые отличия относятся к минорным полипептидным компонентам цитоскелетных фракций (см. рис. 1). В процессе роста злокачественной опухоли крыс саркома-45 происходит нарастающее во времени увеличение содержания актина, ассоциированного с плазматической мембраной преимущественно в полимерной форме (рис. 2). Одновременно наблюдается повышение относительного содержания фибриллярного актина и полимерной формы тубулина в составе цитоскелета саркомы-45. Вместе с тем общее содержание полимерных и мономерных форм актина в цитоплазматической фракции клеток саркомы-45 остается неизменным в процессе роста опухоли. При этом обнаруживается перераспределение различных форм актина в цитоплазматической фракции злокачественных клеток: растет содержание полимерного фибриллярного актина при снижении содержания глобулярного актина (см. рис. 2). Аналогичная реакция цитоскелета выявлена и при исследовании клеток карциносаркомы Уокера 256 (рис. 3). В процессе прогрессии карциносаркомы Уокера 256 происходит накопление фибриллярного актина в цитоплазматической и цитоскелетной фракциях, а также в составе плазматической мембраны, снижение содержания мономеров актина и увеличение содержания полимерных форм тубулина. Следует отметить, что в этом случае содержание тубулина и различных агрегатных форм актина несколько ниже, чем в клетках саркомы-45, а динамика реорганизации цитоскелета в процессе роста опухоли имеет менее выраженный характер.

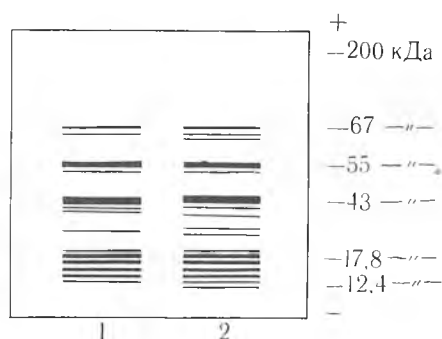


Рис. 1. Электрофоретический анализ в 15 %-м ПААГ в присутствии ДСН белков цитоскелета:

1 — клеток саркомы-45; 2 — клеток карциносаркомы Уокера 256. Маркеры молекулярной массы: тяжелые цепи миозина (200 кДа); бычий сывороточный альбумин (67 кДа); тубулин мозга быка (55 кДа); скелетно-мышечный актин (43 кДа); миоглобин (17,8 кДа); цитохром С (12,4 кДа)

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в процессе опухолевого роста происходит значительная реорганизация цитоскелетных структур злокачественных клеток. В процессе роста злокачествен-

ных опухолей крыс саркома-45 и карциносаркома Уокера 256, различающихся по гистогенезу и скорости роста, формируется однотипная реакция компонентов цитоскелета. По-видимому, в основе этого явления лежит активация регуляторных механизмов, направленных на стимуляцию процессов полимеризации глобулярного актина и мономеров тубулина, что приводит к накоплению полимерных форм этих белков в составе цитоскелета и плазматических мембран. В клетках полимерные и мономерные формы актина и тубулина находятся в состоянии динамического равновесия, которое чрезвычайно чувствительно к воздействию разнообразных физико-химических и биологических факторов и контролируется специфическими регуляторными кальций-зависимыми белками [1, 2]. Можно предположить, что обнаруженные нами изменения citoархитектуры злокачественных клеток в процессе роста опухолей определяются изменением активности этих регуляторных белков вследствие изменения метаболизма кальция, микроокружения злокачественных клеток, а также накопления токсичных продуктов деградации некротизированных участков опухолей. Последнее обстоятельство может определять развитие неспецифической защитной реакции клеток к повреждающему действию, так как повышение вязкости цитоплазмы и увеличение содержания Ф-актина в клетках является одной из составных частей неспецифического адаптационного синдрома клеточной системы в ответ на различные раздражители [14].

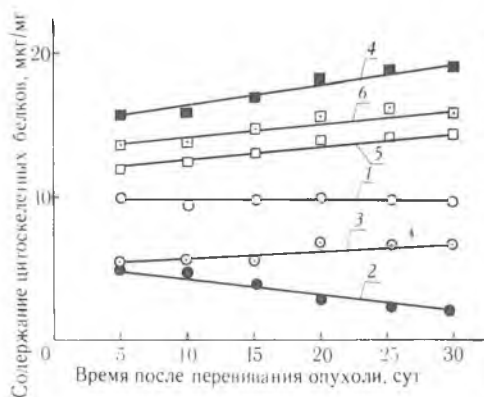


Рис. 2. Динамика содержания цитоскелетных белков в процессе роста злокачественной опухоли крыс саркома-45:

1 — общее содержание актина в цитоплазматической фракции; 2 — содержание Г-актина в цитоплазматической фракции; 3 — содержание Ф-актина в цитоплазматической фракции; 4 — содержание актина в составе цитоскелета; 5 — содержание актина в составе плазматической мембраны; 6 — содержание тубулина в составе цитоскелета

Рис. 3. Динамика содержания цитоскелетных белков в процессе роста карциносаркомы Уокера 256:

1 — общее содержание актина в цитоплазматической фракции; 2 — содержание Г-актина в цитоплазматической фракции; 3 — содержание Ф-актина в цитоплазматической фракции; 4 — содержание актина в составе цитоскелета; 5 — содержание актина в составе плазматической мембраны; 6 — содержание тубулина в составе цитоскелета

1. Бен-Зеев А. // Biochim. Biophys. Acta. 1985. V. 780, № 3. P. 197.
2. Jacob M. // Genet. Eng. News. 1987. V. 7. № 5. P. 14.
3. Leavitt J., Ng S.-Y., Verma M., Latter G., Burbeck S. // Mol. Cell Biol. 1987. V. 7. № 7. P. 2467.
4. Сенчук В. В., Пикунев А. Т., Дашкевич И. Н. // Биохимия. 1991. Т. 56. № 12. С. 2235.
5. Ходосова И. А. Ферменты опухолевых клеток. Л., 1988.
6. Чернов В. А. Методы экспериментальной терапии. М., 1971.
7. Погосянц Е. Е., Киселева Н. С. // Вопр. онкологии. 1963. Т. 9. № 8. С. 103.
8. Биохимическое исследование мембран. / Под ред. Э. Мэдди. М., 1979.
9. Jacob T. S., Bhargava P. M. // Exp. Cell Res. 1962. V. 27. № 3. P. 453.
10. Brown S., Levinson V., Spudis J. A. // Journ. Supramol. Struct. 1976. V. 5. № 1. P. 119.
11. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование. М., 1981.
12. Barden J. A., Remedios C. G. // Journ. Biochem. 1984. V. 96. № 3. P. 913.
13. Petersson G. L. // Meth. Enzym. 1983. V. 91. № 1. P. 95.
14. Браун А. Д., Моженко Т. П. Неспецифический адаптационный синдром клеточной активности. Л., 1987.