УДК 576.08: 576.385.5: 618.14-006.36-089.87-076: 615.275

ВЛИЯНИЕ ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ФАКТОРА РОСТА-β_2 НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК ЛЕЙОМИОМЫ МАТКИ

Нигора Джураевна Муратова[1], Анвар Арсланбекович Абдувалиев[2]*

[1]Ташкентский педиатрический медицинский институт, г. Ташкент, Узбекистан;
[2]Ташкентская медицинская академия, г. Ташкент, Узбекистан

Реферат **DOI: 10.17750/KMJ2015-968**

Цель. Изучение роли трансформирующего фактора роста-β_2 в патогенезе лейомиомы матки.

Методы. Были проведены исследования по определению цитотоксической активности трансформирующего фактора роста-β_2 в отношении временной культуры клеток. Использован операционный материал от 2 женщин репродуктивного возраста с миомой матки (симптоматическая множественная миома матки, пролиферирующий тип), подвергшихся ампутации матки. Средний возраст больных составлял 43,5±0,57 года. Полученные клетки временной культуры были разделены на пять групп в зависимости от воздействующей дозы трансформирующего фактора роста-β_2 (1000, 500, 100, 10 мкг/10×10^6, а также культура без воздействия). По окончании инкубации под увеличением в 280 раз производили подсчёт живых и погибших клеток. Цитотоксическую активность выражали в процентах живых и погибших клеток.

Результаты. Суммарная гибель клеток (некроз) в случае применения фактора в дозе 10 мкг/10×10^6 клеток составила 23,0%, в дозе 100 мкг/10×10^6 клеток – 34,5%, в дозе 500 мкг/10×10^6 клеток – 44%, в дозе 1000 мкг/10×10^6 клеток – 59,5%. Наибольшую эффективность подавления жизнедеятельности трансформированных клеток наблюдали при воздействии трансформирующего фактора роста-β_2 в дозе 1000 мкг/10×10^6 клеток.

Вывод. Трансформирующий фактор роста-β_2 способен при определённых условиях и дозе супрессировать рост пролиферирующей миомы матки, обладает выраженным дозозависимым цитотоксическим эффектом в отношении данного новообразования.

Ключевые слова: лейомиома матки, трансформирующий фактор роста, пролиферация.

EFFECT OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR-β_2 ON UTERINE LEIOMYOMA CELLS PROLIFERATION

N.D. Muratova[1], A.A. Abduvaliev[2]
[1]Tashkent Pediatric Medical Institute, Tashkent, Uzbekistan;
[2]TashkentMedical Academy, Tashkent, Uzbekistan

Aim. To study the role of transforming growth factor-β_2 in the uterine leiomyoma pathogenesis.

Methods. Studies to determine the cytotoxic activity of the transforming growth factor-β_2 regarding the temporary cell culture were conducted. The operational material was used from two women of reproductive age with uterine myoma (multiple symptomatic uterine myoma, proliferative type) who underwent hysterectomy. Patients mean age was 43.5±0.57. Obtained temporary culture cells were split into five groups depending on the transforming growth factor-β_2 affecting dose (1000, 500, 100, 10 μg/10×10^6, and culture with no exposure). After incubation living and dead cells were counted at 280 times magnification. The cytotoxic activity was expressed as a percentage of live and dead cells.

Results. Total cell death (necrosis) was 23.0% when using factor at the dose 10 μg/10×10^6 cells, at the dose 100 μg/ 10×10^6 cells – 34.5%, at the dose 500 μg/10×10^6 cells – 44%, at the dose 1000 μg/10×10^6 cells – 59.5%. The most effective vital life suppressing activity of the transformed cells was observed when exposed to transforming growth factor-β_2 at the dose 1000 μg/10×10^6 cells.

Conclusion. Transforming growth factor-β_2 is capable to suppress the proliferating uterine fibroids growth under certain conditions and the dose, it has a significant dose-dependent cytotoxic effect in respect of the neoplasm.

Keywords: uterine leiomyoma, transforming growth factor, proliferation.

Трансформирующий фактор роста (TGF – от англ. Transforming growth factor) играет ключевую роль в клеточной миграции, пролиферации и дифференцировке тканей, воспалении, ремоделировании соединительной ткани, развитии фиброза.

Семейство TGF-β [11] включает группу гомологичных гетеродимерных белков: TGF-β_1, TGF-β_2, TGF-β_3, TGF-β_4. Основная изоформа, секретируемая клетками иммунной системы, – TGF-β_1.

Белки семейства TGF-β синтезируются в виде препропептида, из которого в результате процессинга отщепляются сигнальный пептид и продомен с образованием зрелого белка. Пропептид, или LAP (от англ. Latency Associated Peptide – латентно ассоциированный пептид), остаётся связанным со зрелой молекулой нековалентными взаимодействиями. Благодаря этому зрелая молекула белка представляет собой биологически неактивную, латентную форму, в виде которой TGF-β содержится в экстрацеллюлярном матриксе. Активация TGF-β происходит путём отщепления пропептида LAP с участием протеаз, интегринов, активных форм кислорода, изменения pH [12].

Благодаря своей димерной структуре TGF-β способен одновременно взаимодействовать с обоими типами (I и II) специфических рецепторов, тогда как рецептор III типа стерически способствует этому процессу. Связывание гетеро- или гомодимеров лиганда с внеклеточным доменом рецептора II типа приводит к взаимодействию его с рецептором I типа и фосфорилированию SG-субдомена (содержащего последовательность SGSGSG) его внутриклеточного домена. Рецептор I типа обладает серин/треонинкиназной активностью и фосфорилирует ряд Smad-белков

Адрес для переписки: muratova-84@yandex.ru

(Sma and Mad related proteins).

В настоящее время известно несколько различных Smad-белков, которые подразделяют на три типа: активируемые рецептором R-Smad (Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 и Smad8), которые образуют комплексы с так называемым общим Smad-белком (Smad4) и проникают внутрь ядра, а также ингибиторные I-Smad (Smad6 и Smad7). Классический сигнальный каскад включает фосфорилирование рецептором I типа и активирование Smad2 и Smad3, их гетеромеризацию с участием Smad4 и проникновение гетеромерного комплекса внутрь ядра, где они выполняют функцию факторов транскрипции [5].

В эпителиальных клетках передача сигнала может осуществляться путём активации Smad1 и Smad5 с последующей ассоциацией со Smad4 и ядерной транслокацией. Все R-Smad содержат на N-конце MH1-домен, способный связываться с дезоксирибонуклеиновой кислотой, а на С-конце – MH2-домен, участвующий в белок-белковых взаимодействиях. Smad-белки участвуют в процессе транскрипции двумя способами: либо непосредственно связываясь с SBE-элементами (Smad Binding Element) промотерных участков генов-мишеней с участием своего MH1-домена, либо взаимодействуя с другими факторами транскрипции через свой MH2-домен [9].

TGF-β может активировать не только канонический каскад Smad-белков, но и другие сигнальные пути. В экспериментах на различных клеточных линиях описана TGF-β-зависимая активация Erk1/2, JNK и p38, PI3K, а также Ras и Rho-подобных малых гуанозинтрифосфатаз [4]. Благодаря этому осуществляется перекрёстное взаимодействие между различными путями. Показано участие компонентов MAP (митоген-активируемых протеинкиназ) – сигнального пути в нормальных эпителиальных клетках рака молочной железы, опухолевых клетках NIH 3T3, клетках гепатоцеллюлярной карциномы HepG2 и фибросаркомы HT1080. Взаимодействие нескольких сигнальных каскадов может осуществляться путём модуляции активности Smad-белков с участием Wnt-, IFN-g/STAT-сигнальных путей [7, 10].

Перекрёстные связи с другими путями передачи сигнала могут реализовываться посредством активации рецепторов TGF-β белками семейства эпидермального фактора роста [8]. Таким образом, возможность интеграции нескольких сигнальных путей непосредственно и опосредованно активируемых TGF-β рассматривают в настоящее время в качестве одного из возможных механизмов его неоднозначного функционирования в процессах злокачественной трансформации и прогрессирования опухоли.

Целью данного исследования было изучение роли TGF-β_2 в патогенезе лейомиомы матки.

Для определения цитотоксической роли TGF-β_2 нами были проведены культуральные исследования *in vitro* операционных образцов миомы матки пролиферирующего типа.

Цитотоксическую активность TGF-β_2 определяли, согласно методике окрашивания опухолевых клеток трипановым синим [1]. Для этого считали количество обнаруженных клеток: клетки с окрашенной в голубой цвет цитоплазмой (некротические погибшие клетки); неокрашенные живые клетки в 100 встреченных на 1 участке препарата клеток. Подсчёт производили не менее чем на 10 разных участках одного препарата, после чего находили среднее значение обнаруженных живых и погибших клеток по формуле:

$$X = \frac{(X_1 + X_2 + X_3 ... + X_n)}{n},$$

где X_1, X_2, X_3, ..., X_n – значения подсчёта живых и погибших клеток в каждом из участков исследуемого препарата; n – количество участков; X – среднее значение количества погибших клеток в препарате в процентах (%).

Цитотоксическую активность выражали в процентах живых и погибших клеток. В лунки планшета с клетками вносили исследуемые препараты, растворённые в изотоническом растворе натрия хлорида [1].

Полученные клетки временной культуры были разбиты на пять групп:

- группа I – воздействие TGF-β_2 в дозе 1000 мкг/10×10^6 клеток в течение 60 мин;
- группа II – воздействие TGF-β_2 в дозе 500 мкг/10×10^6 клеток в течение 60 мин;
- группа III – воздействие TGF-β_2 в дозе 100 мкг/10×10^6 клеток в течение 60 мин;
- группа IV – воздействие TGF-β_2 в дозе 10 мкг/10×10^6 клеток в течение 60 мин;
- группа V – клетки без воздействия (контроль).

Для проведения культуральных исследований нами было исследовано 2 макропрепарата – миоматозно-изменённые матки, удалённые во время ампутации матки у женщин репродуктивного возраста. Из каждого макропрепарата были взяты образцы с различных участков миометрия и узлов. Из последних была получена временная культура, которая в последующем была разбита на пять групп (в зависимости от дозы фактора роста).

Средний возраст пациенток, подвергшихся радикальным операциям, составлял 43,5±0,57 года. До оперативного лечения женщины не получали медикаментозного лечения. Показанием к операции были симптоматическая миома матки (кровотечения, боли), быстрый рост миомы за 1 год наблюдения, множественная миома.

Результаты влияния TGF-β_2 в отношении клеток пролиферирующей лейомиомы матки в условиях *in vitro* приведены в табл. 1.

Как видно из полученных результатов, TGF-β_2 обладает выраженным дозозависимым цитотоксическим эффектом в отношении клеток пролиферирующей лейомиомы матки. Суммарная гибель клеток (некроз) в случае применения фактора в дозе 10 мкг/10×10^6 клеток составила 23,0%, в дозе 100 мкг/10×10^6 кле-

© 62. «Казанский мед. ж.», №6

Таблица 1

Цитотоксическая активность трансформирующего фактора роста-β_2 (TGF-β_2) в отношении клеток пролиферирующей лейомиомы матки *in vitro*

№	Группа	Количество исследованных клеток	Погибшие клетки, %	Живые клетки, %
1	TGF-β_2, 1000 мкг/10×10^6 клеток	1000	56,5±4,5*	41,0±5,0*
2	TGF-β_2, 500 мкг/10×10^6 клеток	1000	41,0±5,0*	56,0±4,0*
3	TGF-β_2, 100 мкг/10×10^6 клеток	1000	32,5±3,0*	66,5±4,5*
4	TGF-β_2, 10 мкг/10×10^6 клеток	1000	21,0±2,0	77,0±2,0
5	Контроль	1000	19,5±1,5	80,5±1,5

Примечание: *p <0,05 по сравнению с контролем.

ток – 34,5%, в дозе 500 мкг/10×10^6 клеток – 44%, в дозе 1000 мкг/10×10^6 клеток – 59,5%. Наибольшую эффективность подавления жизнедеятельности трансформированных клеток мы наблюдали при воздействии TGF-β_2 в дозе 1000 мкг/10×10^6 клеток (см. табл. 1).

Функциональная роль TGF-β_2 в процессе канцерогенеза сложна и затрагивает диаметрально противоположные процессы – супрессию и промоцию опухолевого роста. Способность TGF-β_2 ингибировать пролиферацию клеток, а также индуцировать апоптоз и снижать активность теломеразы лежит в основе механизмов супрессии опухолей [3].

Антипролиферативное действие TGF-β_2 основано на активации ингибиторов циклинзависимых киназ семейств Ink4 и Cip/Kip, приводящей к остановке клеточного цикла. Связывание TGF-β со своим рецептором вызывает образование транскрипционных комплексов Smad4-Smad2,3, которые транслоцируются из цитоплазмы в ядро. Это приводит к активации генов ингибиторов циклинзависимых киназ p21WAF1/CIP1, p15INK4b, p27KIP1a и репрессии гена MYC, что вызывает подавление активности Cdk4,6 и Cdk2, ответственных за продвижение по G1 и вход в S-фазу [6].

ВЫВОД

Проведённые нами исследования показали, что трансформирующий фактор роста-β_2 в процессе роста лейомиомы матки способен при определённых условиях и дозе супрессировать опухолевый рост. Наибольшую эффективность подавления жизнедеятельности клеток новообразования мы наблюдали при воздействии TGF-β_2 в дозе 1000 мкг/10×10^6 клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абдувалиев А.А., Гильдиева М.С. Дифференциальное окрашивание опухолевых клеток трипановым синим для определения апоптоза. *Клин. лаб. диагност*. 2006: (2): 36–38. [Abduvaliev A.A., Gil'dieva M.S. Differential trypan blue stainig of tumor cells for the determination of apoptosis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2006: (2): 36–38. (In Russ.)]

2. Абдувалиев А.А., Гильдиева М.С., Татарский В.П. Способ определения индивидуальной лекарственной чувствительности к противоопухолевым препаратам. *Клин. лаб. диагност.* 2006; (5): 50–52. [Abduvaliev A.A., Gil'dieva M.S., Tatarskiy V.P Procedure for determination of drug sensitivity to antitumor agents. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2006; (5): 50–52. (In Russ.)]

3. Biswas S., Criswell T., Wang C. Inhibition of transforming growth factor-B signaling in human cancer: targeting a tumor suppressor network as a therapeutic strategy. *Clin. Cancer Res*. 2006; 12 (14): 4142–4146.

4. Javelaud D., Mauviel A. Crosstalk mechanisms between the mitogen-activated protein kinase pathways and Smad signaling downstream of TGF-beta: implications for carcinogenesis. *Oncogene*. 2005; 24: 5742–5750.

5. Kajdaniuk D., Marek B., Borgiel-Marek H., Kos-Kudła B. Transforming growth factor β_1 (TGFβ_1) in physiology and pathology. *Endokrynol. Pol.* 2013; 64 (5): 384–396.

6. Kaminska B., Kocyk M., Kijewska M. TGF beta signaling and its role in glioma pathogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol*. 2013; 986: 171–187.

7. Minhajat R., Mori D., Yamasaki F. Organ-specific endoglin (CD105) expression in the angiogenesis of human cancers. *Pathol. Int*. 2006; 56: 717–723.

8. Prud'homme G.J., Glinka Y. Neuropilins are multifunctional coreceptors involved in tumor initiation, growth, metastasis and immunity. *Oncotarget*. 2012; 3 (9): 921–939.

9. Ribatti D. Mast cells and macrophages exert beneficial and detrimental effects on tumor progression and angiogenesis. *Immunol. Lett*. 2013; 152 (2): 83–88.

10. Samarakoon R., Overstreet J.M., Higgins P.J. TGF-β signaling in tissue fibrosis: redox controls, target genes and therapeutic opportunities. *Cell Signal*. 2013; 25 (1): 264–268.

11. Santos J.I., Teixeira A.L., Dias F. et al. Restoring TGFβ_1 pathway-related microRNAs: possible impact in metastatic prostate cancer development. *Tumour. Biol*. 2014; 35 (7): 6245–6253.

12. Zeglinski M.R., Hnatowich M., Jassal D.S., Dixon I.M. SnoN as a novel negative regulator of TGF-β/Smad signaling: a target for tailoring organ fibrosis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 2015; 308 (2): H75–H82.