

ВЛИЯНИЕ ЭНДОГЕННЫХ ИНГИБИТОРОВ НА ПОЛИФЕРАЦИЮ ГЕПАТОЦИТОВ РЕГЕНЕРИРУЮЩЕЙ ПЕЧЕНИ

Е.А. Шенцева

Механизмы регуляции пролиферации клеток представляют интерес для специалистов различных научных направлений, так как изменение интенсивности пролиферации клеток осуществляется в процессе онтогенеза, адаптации к разнообразным факторам среды [1], а нарушения в процессах регуляции пролиферации приводят к появлению патологий и, в частности, к онкологическим заболеваниям [2]. Современные подходы к решению этой проблемы основаны на исследовании механизмов действия эндогенных регуляторов клеточной пролиферации и прежде всего факторов роста [3]. Как известно, механизмы регуляции пролиферации клеток находятся под контролем стимуляторов клеточного деления [4]. Еще в 70-х годах было показано, что во многих тканях организма синтезируются ингибиторы клеточного деления – кейлоны [5]. Многочисленные работы по исследованию этой группы веществ показали, что они не видо-, а тканеспецифичны [6], нетоксичны и характеризуются кратковременностью действия [4]. Большинство работ по исследованию кейлонов было направлено на практическое применение их в медицине. Главным ограничением на пути использования кейлонов в фундаментальных исследованиях и практической медицине стало отсутствие единого мнения о механизме их действия и, как следствие, отсутствие обоснованных схем введения и использования кейлонов. Однако совершенно бесспорно, что кейлоны являются веществами эндогенной природы, участвующими в регуляции клеточной пролиферации. В пользу этого свидетельствуют современные экспериментальные работы [7].

Классической моделью индукции пролиферации является регенерирующая печень. Несмотря на многочисленные работы по действию кейлонов на пролиферацию гепатоцитов, такие важные вопросы, как продолжительность и обратимость действия кейлонов, определение их функциональной активности на разных этапах онтогенеза, анализ их точки приложения в метаболической цепи, остаются нерешенными, а имеющиеся данные достаточно противоречивы. Практически отсутствуют работы, в которых авторы применяли бы кинетический подход.

В настоящей работе представлены данные о продолжительности ингибирования клеточного деления кейлонсодержащей фракции и возможной обратимости действия.

Эксперименты проводили на крысах линии Вистар 1- и 3-месячного возраста. Гепатэктомия проводили общепринятым методом. Кейлонсодержащую фракцию выделяли из печени 12-месячных животных. Белковый состав полученной фракции исследовали с использованием электрофореза в ПААГ и гель-фильтрацией на сефадексе С-75. Об активности кейлонов судили по изменению величины удельной радиоактивности ДНК (имп./ мин.мг).

Известно, что спустя 20-24 ч после частичной гепатэктомии около 30-35% гепатоцитов находится в S-периоде клеточного цикла [8]. Также известно, что однократное введение кейлонов приводит к ингибированию синтеза ДНК на уровне клеточной популяции, т.е. уменьшению числа S-клеток вследствие блокирования перехода G-S [5].

Определение динамики удельной радиоактивности ДНК в клетках печени после удаления 2/3 ее массы показало, что пик синтеза ДНК соответствует 24 ч после операции. Однократное введение 15 мг/100г кейлонсодержащей фракции за 8 ч до наступления пика синтеза ДНК снижало удельную радиоактивность ДНК в 4,2 раза по сравнению с контролем. В следующей серии экспериментов кейлонсодержащая фракция в такой же дозе вводилась через 1 ч после операции, т.е. за 23 ч до наступления пика синтеза ДНК, и определялась динамика удельной радиоактивности ДНК с 20 до 32 ч после частичной гепатэктомии. Оказалось, что и в этом случае кейлонсодержащая фракция уменьшала удельную радиоактивность ДНК по сравнению с контролем, хотя и в меньшей степени, чем

при 8-часовой экспозиции (в 3 раза). Таким образом, снижение удельной радиоактивности ДНК в S-периоде контрольного варианта остается на постоянном уровне с 20 по 32 ч после операции, а снижение удельной радиоактивности ДНК в S-периоде происходит под действием кейлонсодержащей фракции при введении ее как за 8, так и за 23 ч до наступления пика синтеза ДНК. Следовательно, можно предположить, что время действия кейлонов не столь кратковременно (4-8 ч), как предполагали некоторые авторы [4].

Длительность действия кейлонов может быть обусловлена не прямым их действием на клетку, а опосредованным – на регуляторные системы организма. Одним из подходов в решении этого вопроса является определение тканевой локализации кейлонов и время их нахождения в тканях-мишенях. Исходя из этого определялось распределение ^{14}C кейлонов, вводимых однократно. После внутрибрюшинного введения меченых кейлонов метка обнаруживалась в основном в печени и сыворотке крови, в то время как селезенка, легкие и сердце не связывали меченые молекулы ингибитора. Необходимо отметить, что от 20 до 50% уровня радиоактивности в зависимости от времени экспозиции обнаруживается в сыворотке крови с максимальным содержанием через 3 ч и снижением к 12 ч после введения. ^{14}C кейлонов связываются с печенью очень быстро, уже через 15 мин. после введения обнаруживается высокий уровень метки, однако пик связывания наступает к 3 ч после инъекции и остается на этом уровне вплоть до 12 ч. Полученные результаты указывают на то, что максимальный эффект действия кейлонов может наступить через 3 ч и оставаться на таком уровне достаточно длительное время, по крайней мере не менее 12 ч.

Если исходить из того, что кейлоны задерживают переход гепатоцитов из G1 в S-период, то после снятия их действия можно ожидать некоторое увеличение скорости синтеза ДНК. Однако удельная радиоактивность ДНК с 20 до 32 ч остается на постоянном уровне и, следовательно, массового одновременного возвращения гепатоцитов в цикл не наблюдается. Последнее может привести к задержке восстановления печени по сравнению с контролем. Для проверки этого предположения определяли динамику синтеза ДНК в поздние периоды после операции и восстановление массы печени в контроле и опыте.

Динамика удельной радиоактивности ДНК на фоне действия кейлонсодержащей фракции и в контроле через 48-192 ч после операции была одинаковой. Не различалась и масса печени в контрольном и опытном вариантах на 8-е сутки после операции.

Таким образом, несмотря на уменьшение удельной радиоактивности ДНК в регенерирующей печени под действием кейлонсодержащей фракции и продолжительности ее действия, она не оказывала влияние на восстановление массы печени.

Такой результат может быть связан с тем, что кейлоны задерживают переход G1→S и исключают таким образом часть гепатоцитов из клеточного цикла. Если этот процесс имеет место, можно ожидать, что при многократных введениях кейлонсодержащей фракции только часть гепатоцитов может быть временно исключена из цикла, а новая популяция клеток, которая вступит в цикл в ответ на это, будет резистентной к действию кейлонов.

В следующей серии экспериментов животным вводили 15 мг на 100 г массы тела кейлонсодержащей фракции дважды в сутки в 8 и 20 ч на протяжении 1, 3, 5 и 7 суток после операции. Величина удельной радиоактивности ДНК в контрольной регенерирующей печени уменьшилась с 1 по 7 сутки в 10 раз. Кейлонсодержащая фракция уменьшила этот показатель через 24 ч в 3 раза по сравнению с контролем, однако в дальнейшем разница между контролем и опытом уменьшилась и на 5-е сутки исчезла совсем. Спустя 7 суток после операции удельная радиоактивность ДНК превосходила таковую в контроле. Учитывая то, что многократные введения кейлонов могут вызывать «неспецифическое» действие на пролиферацию клеток печени, было исследовано влияние многократных введений сывороточного альбумина на удельную радиоактивность ДНК в клетках печени крыс.

Обнаружено, что удельная радиоактивность ДНК в клетках печени крыс, которым многократно вводили физиологический раствор, составляла 92 023 имп/мин на 1 мг ДНК и

80 772 – спустя 3 и 5 суток после начала эксперимента, а у животных, получавших альбумин (15 мг/100 г тела), соответственно 68 657 и 84 623. Хотя альбумин несколько и снижал удельную радиоактивность ДНК в клетках печени спустя 3 суток, этот эффект был значительно ниже по сравнению с действием кейлонов. Следовательно, даже при двукратных ежедневных введениях кейлонсодержащей фракции ингибирование синтеза ДНК выявляется только в первый пик синтеза ДНК, в дальнейшем гепатоциты нечувствительны к действию кейлонов.

В последние годы проводятся исследования механизмов действия трансформирующих факторов роста (TGF- β 1), очевидно, входящих в состав кейлонсодержащей фракции [9]. Было показано, что они ингибируют рост разных типов клеток, а трансформация клеток вирусом SV-40 делает их резистентными к TGF- β 1. Другими авторами показано [10], что внесение сыворотки в культуру WB индуцирует вступление их в S-фазу, а внесение TGF- β 1 ингибирует включение метки в ДНК. С возрастом пассажей клетки становились нечувствительными к трансформирующему фактору роста, что совпадает с нашими данными, полученными в экспериментах на модели регенерирующей печени.

Таким образом, печеночные кейлоны специфически связываются с клетками печени, где они удерживаются не менее 12 ч; их действие направлено на отдельную популяцию гепатоцитов, и оно достаточно продолжительно, что, очевидно, приводит к вхождению в цикл новой популяции гепатоцитов, резистентной к действию кейлонов.

Библиографический список

1. *Ledda-Columbano G.M., Columbano A., Curto M., Ceni P. et al // Carcinogenesis. - 1989. - №10. – S. 847-850.*
2. *Kusche J., Mennigen R. and Erpenbach K. // Angest and Actions. - 1988. - №23. - S. 354-356.*
3. *Brow K.D., Gomperts M and Pascall J.C. // Edocrinol. - 1991. - S. 129, 397.*
4. *Балаж А., Блажек И. Эндогенные ингибиторы клеточной пролиферации. - М.: Мир, 1982. - 302 с.*
5. *Романов Ю.А. и др. Кейлоны и регуляция деления клеток. - М.: Медицина, 1984. - 208 с.*
6. *Elgio K., Clausen O.P., and Thernd E // Cell Tiss. Kinet. -№ 14. - S. 21-29.*
7. *Гембицкий Д.С. и др. Бюлл. эксперим. биологии и медицины. - М., 1994. - №117. - С. 80-82.*
8. *Сидорова В Ф, Рябинкина З.А., Лейкина Е.М. Регенерация печени у млекопитающих. - М.: Медицина, 1966. - 208 с.*
9. *Nose R., Shibanuma M and Kuroki T. // Cell Biochem. - 1992. - 16 B. - S. 162.*
10. *Moses // Cell Diochem. - 1992. - 16A. - S. 6.*