

УДК 616.36-002.3:616.567-465.478-03
© Смирнов С.Н., 2009

РЕГУЛЯЦИЯ ДНК-СИНТЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И СОСТОЯНИЯ ФРАКЦИИ РОСТА ГЕПАТОЦИТОВ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА Смирнов С.Н.

Луганский государственный медицинский университет

Смирнов С.Н. Регуляция ДНК-синтетической активности и состояния фракции роста гепатоцитов крыс разного возраста // Украинський морфологічний альманах. – 2009. – Т. 7, № 2. – С. 95-97.

Цель данного исследования состояла в изучении регуляторных эффектов кейлонсодержащего экстракта и эпидермального фактора роста, которые являются составляющими многокомпонентной системы регуляции деления гепатоцитов. Было установлено, что процессы, обеспечивающие деление гепатоцитов, имеют возрастные особенности. Интенсивность синтеза ДНК с увеличением возраста постепенно уменьшается. В период с третьего по двенадцатый день жизни крыс наблюдается процесс увеличения фракции роста. В регуляции процессов деления гепатоцитов принимают участие различные факторы, в том числе эпидермальный фактор роста, а также факторы, входящие в кейлонсодержащий экстракт. Они оказывают влияние на интенсивность синтеза ДНК и на величину фракции роста. Роль указанных компонентов различна, имеются также возрастные особенности их влияния. Кейлонсодержащий экстракт не вызывал изменений средней ДНК-синтетической активности в печени трехдневных крыс, в возрасте семи дней он увеличивал, а в возрасте двенадцати дней – уменьшал ее. Онтогенетические особенности действия эпидермального фактора роста оказались иными: у трехдневных и у семидневных крыс его введение приводило к уменьшению, а у двенадцатидневных – к увеличению средней ДНК-синтетической активности.

Ключевые слова: клеточное деление, гепатоциты, онтогенез, крысы.

Смирнов С.М. Регуляція ДНК-синтетичної активності і стану фракції росту гепатоцитів щурів різного віку // Український морфологічний альманах. – 2009. – Т. 7, № 2. – С. 95-97.

Мета даного дослідження полягала у вивченні регуляторних ефектів кейлонвмісного екстракту та епідермального чинника росту, які є елементами багатокомпонентної системи регуляції поділу гепатоцитів. Було встановлено, що процеси, що забезпечують поділ гепатоцитів, мають вікові особливості. Інтенсивність синтезу ДНК з віком зменшується. У період з третього по дванадцятий день життя щурів спостерігається процес збільшення фракції росту. У регуляції процесів поділу гепатоцитів беруть участь різні чинники, зокрема епідермальний чинник росту, а також чинники, що входять до кейлонвмісного екстракту. Вони здійснюють вплив на інтенсивність синтезу ДНК і на величину фракції росту. Роль вказаних компонентів різна, є також вікові особливості їх впливу. Кейлонвмісний екстракт не викликав змін середньої ДНК-синтетичної активності в печінці триденних щурів, у віці семи днів він збільшував, а у віці дванадцяти днів – зменшував її. Онтогенетичні особливості дії епідермального чинника росту виявилися іншими: у триденних і у семиденних щурів його введення приводило до зменшення, а у дванадцятиденних – до збільшення середньої ДНК-синтетичної активності.

Ключові слова: клітинний поділ, гепатоцити, онтогенез, щури.

Smirnov S.N. Regulation of DNA-synthetic activity and growth fraction in the hepar of rats during ontogenesis // Український морфологічний альманах. – 2009. – Т. 7, № 2. – С. 95-97.

Regulative role of epidermal growth factor and chalone for DNA-synthetic activity and faction of growth in the liver of rats in ontogenesis has been analysed. It was showed that some effects of epidermal growth factor and chalone are depend on age. In accordance with increase the age the level of DNA synthesis diminished gradually but growth faction became more. Epidermal growth factor and chalone influence on the level of DNA synthesis and on the size of growth fraction. Influences of epidermal growth factor and chalone are different.

Chalone did not cause the changes of DNA synthesis activity in the liver of three-day rats. But chalone increased it in seven-day age and decreased it in twelve-day age. Epidermal growth factor decreased the DNA-synthetic activity of hepatocytes on the third and on the seventh day of life. But epidermal growth factor increased it on the twelfth day of life.

Key words: cell division, hepatocytes, ontogenesis, rats.

Одним из механизмов развития заболеваний печени является нарушение баланса в процессах клеточной дифференцировки, клеточной гибели и клеточного деления [5, 8]. В оценке состояния процессов клеточного деления значимыми параметрами являются ДНК-синтетическая активность и величина фракции роста [3, 9]. Изучение путей воздействия на состояние этих параметров позволяет определить подходы к их

коррекции при возникновении патологических процессов в печени [7].

Цель данного исследования состояла в изучении регуляторных эффектов кейлонсодержащего экстракта и эпидермального фактора роста, которые являются составляющими многокомпонентной системы регуляции деления клеток различных тканей и, в том числе, гепатоцитов [4, 6].

Статья является фрагментом плановых научных работ кафедры медицинской биологии Луганского государственного медицинского университета «Структурный гомеостаз тканей пищеварительного тракта, выделительной системы и интегрирующих систем организма (эндокринной, нервной и иммунной), его регуляция и коррекция возникающих изменений в условиях действия экологически опасных факторов» (регистрационный номер 0104U10746) и «Регуляция структурного гомеостаза обновляющихся тканей и коррекция его изменений в условиях действия экзогенных и эндогенных факторов» (регистрационный номер 0199U001828).

Объект и методы исследований. В экспериментах использовали 57 белых беспородных крыс трехдневного, 81 – семидневного и 88 – двенадцатидневного возраста. Крыс каждой возрастной группы разделяли на три равных подгруппы: интактные крысы (получали плацебо), которые служили контролем; крысы, получавшие кейлонсодержащий экстракт (КСЭ); крысы, получавшие эпидермальный фактор роста (ЭФР).

ЭФР, изготовленный в лаборатории «Диагностикум» г. Львов, вводили в дозе 0,5 мг/кг массы тела животных однократно в 9.00. КСЭ по 2 мг на одну крысу в 0,05 мл изотонического раствора натрия хлорида вводили однократно интраперитонеально в 10.00. Использовали КСЭ, который был изготовлен в лаборатории биологии клетки Российского государственного медицинского университета (г. Москва). В методику изготовления КСЭ входили: изготовление ацетонового порошка из печени крыс без соединительной ткани, экстракция фенилметилсульфаниламидом, выделение криостабильной фракции, преципитация в градиенте этилового спирта 55-81% [2].

Фракцию роста определяли путем введения 3Н-тимидина в дозе 3,7 Мбк на 100 г массы тела животных каждые 5 часов на протяжении суток. Радиоактивность 3Н-тимидина была 0,85 Тбк/мМ. Забой крыс проводили в 10 часов вторых суток исследования.

Таблица 1. Среднее значение РИ в печени крыс, получавших КСЭ ($M \pm m$, %)о

Возраст крыс	3 дня		7 дней		12 дней	
	Плацебо	КСЭ	Плацебо	КСЭ	Плацебо	КСЭ
Среднее значение РИ	2,15±0,11	2,20±0,13	1,29±0,06	1,02±0,06	1,15±0,06	1,45±0,07

После введения ЭФР трехдневным крысам средний РИ оказался на 38,1% меньше, чем у крыс, которые получали плацебо ($p < 0,05$). Инъекция ЭФР семидневным крысам сопровождалась уменьшением среднесуточного РИ на 17,8% в сравнении с этим показателем у контрольных животных (получали плацебо) ($p < 0,05$). Одноразовое введение ЭФР двенадцатидневным крысам вызывало увеличение сред-

При исследовании ДНК-синтетической активности каждые 4 часа выводили из эксперимента по 4-5 животных из группы. Первые выведения животных из эксперимента проводили в 13.00. Последние выведения животных из эксперимента осуществляли у 09.00 следующих суток. 3Н-тимидин вводили за 1 час до забоя.

Радиоавтографы на гистологических препаратах печени готовили по общепринятой методике [1]. Подсчет количества меченых ядер проводили не менее чем в 15000 гепатоцитах. Величину фракции роста оценивали по отношению числа клеток с мечеными ядрами к общему числу клеток. Для выражения ДНК-синтетической активности сипользовали радиоактивный индекс (РИ), который определяли по соотношению числа меченых 3Н-тимидином ядер к общему количеству подсчитанных ядер.

Оценку достоверности результатов исследования проводили по критерию t Фишера-Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования. После одноразового введения КСЭ трехдневным крысам средняя интенсивность синтеза ДНК гепатоцитами (РИ) в сравнении с крысами, которым вводили плацебо, практически не изменялась (таблица 1). В печени семидневных крыс КСЭ вызывал уменьшение средней ДНК-синтетической активности (РИ) гепатоцитов на 20,9 % ($p < 0,01$), в сравнении с контролем (крысы, получавшие плацебо). Введение КСЭ сопровождалось увеличением среднесуточного РИ гепатоцитов крыс двенадцатидневного возраста на 26,1 % ($p < 0,05$).

Величина фракции роста гепатоцитов трехдневных крыс после введения КСЭ составила $14,8 \pm 3,19\%$, что на 340,1 % больше, чем в контроле (после введения плацебо), где данный показатель был равен $3,20 \pm 0,42\%$ ($p < 0,05$). В печени двенадцатидневного животных, которые однократно получали КСЭ, величина фракции роста составила $7,52 \pm 1,8\%$ и была больше на 7,6% ($p > 0,05$), чем в крыс, получавших плацебо ($6,99 \pm 1,09\%$).

несуточного РИ на 20,0% ($p < 0,05$) (таблица 2).

Фракция роста в печени трехдневных крыс, которые получали ЭФР, составила $8,91 \pm 0,94\%$, что на 178,4% больше, чем у животных, которым вводили плацебо ($p < 0,05$). Размер фракции роста в печени двенадцатидневных крыс при этом увеличивался на 222,17% ($p < 0,05$) и был равен $22,52 \pm 7,41\%$.

Таблица 2. Среднее значение РИ в печени крыс, получавших ЭФР ($M \pm m$, %)о

Возраст крыс	3 дня		7 дней		12 дней	
	Плацебо	КСЭ	Плацебо	КСЭ	Плацебо	КСЭ
Среднее значение РИ	2,15±0,11	1,33±0,06	1,29±0,06	1,06±0,05	1,15±0,06	1,38±0,07

Выводы и перспективы дальнейшего исследования в данном направлении. Таким образом, можно сделать следующие выводы:

1. Процессы, обеспечивающие деление гепатоцитов, имеют возрастные особенности. Интенсивность синтеза ДНК с увеличением возраста постепенно уменьшается. Вместе с тем, в период с третьего по двенадцатый день жизни крыс наблюдается процесс увеличения фракции роста.

2. В регуляции процессов деления гепатоцитов принимают участие различные факторы, в том числе ЭФР, а также факторы, входящие в кейлонсодержащий экстракт. Эти факторы оказывают влияние на интенсивность синтеза ДНК и на величину фракции роста.

3. Роль указанных компонентов различна, имеются также возрастные особенности их влияния. Так, если КСЭ не вызывал изменений средней ДНК-синтетической активности в печени трехдневных крыс, то в возрасте семи дней он увеличивал, а в возрасте двенадцати дней – уменьшал ее. Онтогенетические особенности действия ЭФР оказались иными: у трехдневных и у семидневных крыс его введение приводило к уменьшению, а у двенадцатидневных – к увеличению средней ДНК-синтетической активности.

Перспективность исследований в данном направлении определяется тем, что полученные сведения позволят расширить и систематизировать представления об онтогенетических закономерностях регуляции клеточного деления. Это, в свою очередь, дает возможность более детально осмыслить механизмы развития патологических состояний, связанных с изменениями клеточного деления. Основным направлением дальнейших исследований могут стать эксперименты по изучению регуляторных эффектов отдельных регуляторных факторов, а также их комбинаций.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Елифанова О.И., Терских В.В., Захаров А.Ф. Радиоавтография. - М.: Высшая школа, 1977. - 246 с.
2. Мамонтов С.Г., Резников М.И., Крицкий А.М. и др. Суточная динамика связывания тканеспецифических ингибиторов клеточной пролиферации с рецепторами поверхности клеточных мишеней // Биология репродукции клеток. - М.: РГМУ, 1994. - С. 91-95.
3. Смирнов С.Н. Возрастные изменения пролиферативного пула в печени крыс // Украинський медичний альманах. - 2001. - Том 4, № 3. - С. 157 – 158.

4. Смирнов С.М. Роль тканинспецифічних інгібіторів клітинного поділу в регуляції тривалості мітозу гепатоцитів нестатевозрілих щурів // Загальна патологія та патологічна фізіологія. - том 2, № 1. - 2007. - С. 75 – 78.

5. Apte U.M., McRee R., Ramaiah S.K. Hepatocyte proliferation is the possible mechanism for the transient decrease in liver injury during steatosis stage of alcoholic liver disease // Toxicological pathology. - 2004, №32 (5). - P. 567-576.

6. Frémin C, Bessard A, Ezan F, Gailhouste L, Régeard M, Le Seyec J, Gilot D, Pagès G, Pouységur J, Langouët S, Baffet G. Multiple division cycles and long-term survival of hepatocytes are distinctly regulated by extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 // Hepatology. - 2009. - V. 49, № 3. - P. 930-939.

7. Kamohara Y., Haraguchi N., Mimori K., Tanaka F., Inoue H., Mori M., Kanematsu T. The search for cancer stem cells in hepatocellular carcinoma // Surgery. - 2008. - V. 144, № 2. - P 119-124.

8. Kim T.Y., Lee J.W., Kim H.P., Jong H.S., Kim T.Y., Jung M., Bang Y.J. DLC-1, a GTPase-activating protein for Rho, is associated with cell proliferation, morphology, and migration in human hepatocellular carcinoma // Biochemical and biophysical researches Commun. - 2007, № 355 (1). - P. 72-77.

9. Patterson C, Ronnebaum S. Breast cancer quality control // Nat Cell Biol. - 2009. - V.11, №3. - P. 239-241.

Надійшла 21.02.2009 р.

Рецензент: проф. С.М. Федченко