

На правах рукопису *Шенцева*

ШЕНЦЕВА Олена Олександрівна

ВІКОВІ ОСОБЛИВОСТІ КЕЛОННОЇ РЕГУЛЯЦІЇ  
ПРОЛІФЕРАЦІЇ КЛІТИН ПЕЧІНКИ ЩУРІВ

03.00.13. - Фізіологія людини та тварин

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Харків - 1995

Дисертація є рукописом

Робота виконана  
біохімії онтогенезу науково  
Харківського державного

ЛНБ України ім. В. Стефаника



00761195 (Т)

Науковий керівник:

Офіційні опоненти: Бондаренко В. А. - доктор біологічних наук, професор (зав. каф. фізіології людини та тварин ХДУ, зав. відділом фізіології клітин інституту проблем кріобіології та кріомедицини НАН України)  
Жегунов Г. Ф. - доктор біологічних наук, професор (зав. каф. загальної біології Харківського медичного університету).

Провідна установа: НДІ геронтології МОЗ України, м. Київ.

Захист відбудеться "6 вересня" 1995р. о 15<sup>15</sup> годині на засіданні спеціалізованої Вченої ради К 02.02.16 Харківського державного університету (310077, м. Харків, пл. Свободи, 4, аудиторія 3-15)

З дисертацією можна ознайомитися в Центральній науковій бібліотеці Харківського держуніверситету.

Автореферат розісланий "6 вересня" 1995 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої Вченої ради,  
кандидат біологічних наук

О. В. Наглов

ЛНБ ім. В. Стефаника  
АН України

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Проліферація є найважливішою стороною життєдіяльності і розвитку організмів, і її зрушення лежать в основі виникнення багатьох патологічних процесів. Тому визначення механізмів регуляції клітинної проліферації, а тим більше, вміння змінювати їх в потрібному напрямку, без сумніву, є актуальною проблемою біології як у теоретичному, так і в прикладному аспектах.

Регуляція проліферації клітин еукаріот здійснюється різними факторами, серед яких присутні як індуктори, так і інгібітори ділення. Співвідношення між індукторами і інгібіторами є важливим чинником, що регулює проліферацію.

Хімічні речовини, що пригнічують проліферацію клітин, застосовуються в онкології. Однак, більшість з них - токсичні сполуки, які знищують не лише трансформовані клітини, але і викликають небажані побічні ефекти.

В останні роки приділяється велика увага ендегенним специфічним інгібіторам клітинного ділення природного походження як можливим регуляторам клітинної проліферації [Parkinson E. K., Balman A., 1990; Moses H. L., 1992]. Велике значення в регуляції при онкогенезі мають внутрішньотканинні інгібітори, зокрема, кейлони [Parkinson E. K., 1990]. Однак закономірності кейлонної регуляції і її взаємовідношення з іншими елементами загальної системи контролю ділення клітин залишаються недослідженими. Кейлонна система є важливою ланкою регуляції клітинного гомеостазу тканин, що забезпечує внутрішньотканинний контроль за процесами розмноження клітин.

Враховуючи важливу роль кейлонної регуляції для вікового становлення проліферації клітин, можливість використання чинників росту в медичній практиці, значний інтерес має дослідження вікової активності кейлонів печінки, чутливості до них клітин-целей і механізмів їх дії на процеси ділення клітин.

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було дослідження фракційного складу кейлонів печінки, їх кількісної характеристики, біологічної активності і чутливості до них клітин на різних етапах онтогенезу, на різних експериментальних моделях, а також дослідження можливих механізмів їх дії на моделі викликаного проліферації клітин печінки.

В конкретні завдання дослідження входило:

1. Дослідити фракційний склад кейлонів печінки тварин різного віку.

2. Дослідити вміст окремих фракцій кейлонів на різних етапах постнатального онтогенезу шурів.

3. Дослідити активність фракції, яка вміщує кейлон, у печінці і нирках. Визначити чутливість до кейлонів клітин на різних етапах онтогенезу.

4. Дослідити вплив гідрокортизону на активність кейлонів.

5. Дослідити тканинну локалізацію і час дії кейлонів при внутрішньочеревинному введенні їх в організм.

6. Дослідити дію кейлонів на інтенсивність проліферації клітин на моделі печінки, що знаходиться в стані регенерації, при одно- і багаторазових послідовних введеннях кейлонів в організм.

Наукова новизна. Вперше здійснена вікова та кількісна характеристика кейлонів печінки як регуляторів проліферації клітин. Показано, що в процесі онтогенезу відбуваються як кількісні (збільшується низькомолекулярна фракція кейлонів М.м. 17 КДа), так і якісні зміни, зменшується їх активність як у інтактній печінці, так і при її регенерації.

Чутливість гепатоцитів до дії кейлонів також зменшується з віком. Активність кейлонів може змінюватися під впливом різних клітинних метаболітів, її може обумовлювати гормональний статус організму, тобто кейлони входять в систему вікової регуляції проліферації. Вікова система кейлонної регуляції має виражену тканинну особливість, в усякому разі, для печінки и нирок. Показано, що активність кейлонів печінки не така короткочасна, як вважалося раніше, а може зберігатися на високому рівні достатньо довго, не менше 23 годин. Знайдено, що після внутрішньочеревинного введення кейлонів в організм вони швидко зв'язуються в клітинами печінки і утримуються там не менше 12 годин.

Найбільш виражена дія пригнічення проліферації кейлонами спостерігається при одноразовому введенні в організм. Багаторазове послідовне введення кейлонів в організм супроводжується втратою чутливості гепатоцитів до цих інгібіторів.

Основні положення, які виносяться на захист:

1. Кейлонна система онтогенетичної регуляції проліферації характеризується вираженою тканинною специфічністю.

2. Активність кейлонів і чутливість гепатоцитів до їх дії має вікову специфіку.

3. Пригнічувальна активність кейлонів зберігається не

менш, як 23 години після одноразового їх введення в організм.

4. Багаторазові послідовні введення кейлонів в організм супроводжуються втратою чутливості гепатоцитів до них.

Теоретичне та практичне значення роботи. Виконана робота є важливим етапом в дослідженні системи кейлонної регуляції проліферації клітин, вона має загальнобіологічне значення, а також необхідна для розуміння вікової регуляції клітинного ділення.

Досліджена фракція, що вміщує кейлон, може використовуватися як компонент комплексного препарату для вирішення питань, пов'язаних з регуляцією проліферації при різних патологіях.

Одержана фракція, що вміщує кейлон, використовується в наукових дослідженнях як тканинний біохімічний препарат, що пригнічує проліферацію.

Результати роботи використовуються в навчальному процесі в курсі лекцій "Молекулярна біологія" та "Біотехнологія".

Апробація роботи. Матеріали дисертації доповідалися на симпозиумі "Продолжительность жизни: механизмы, прогнозы, пути увеличения" (Київ, 1991 г.), на міжнародному симпозиумі "Биологические механизмы старения" (Харків, 1994 г.), Національному конгресі геронтологів і геріатрів України (Київ, 1994 г.), на науковій конференції молодих вчених біологічного факультету і НДІ біології (Харків, 1993, 1994, 1995 р.).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 10 робіт, в тому числі 5 статей.

Обсяг і структура дисертаційної роботи. Дисертація викладена на 138 сторінках друкарського тексту, включає 6 таблиць, 16 малюнків і складається з вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, викладення одержаних даних і їх обговорення, закінчення, висновків і списку цитованої літератури (231 джерела).

#### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Досліди проводили на щурах лінії Вістар 1-, 3-, 12- і 24-місячного віку, утримуваних на стандартному раціоні віварію.

Активність інгібітора визначали на щурах місячного віку після часткової гепатектомії [Higgins G. M., Andersen R. M., 1931].

При вивченні вікових особливостей впливу кейлонів на проліферацію і вікової динаміки чутливості клітин печінки і

нирок до дії інгібітора одночасно досліджували всі вікові групи інтактних і підслідних тварин. Інгібітори виділяли з печінки і нирок методом Verly в один і той же час доби - о 9 годині ранку, коли його активність найвища [Verly W. G., 1973]. Методи дослідження біологічної активності кейлонів засновані на їх адатності пригнічувати синтез ДНК і мітози.

Для дослідження впливу G-1 кейлонів на рівень питомої радіоактивності ДНК фракцію, що вміщує кейлон, вводили підслідним щурам у дозі 15 мг на 100 г маси тіла тварини за 8 годин до сакрificaції (тобто до настання піку синтезу ДНК), а вплив G-2 кейлонів на рівень мітотичної активності у клітин печінки - за 4 години до сакрificaції в такій же дозі.

Для контролю рівня ДНК в клітинах печінки і нирок усім підслідним тваринам за годину до сакрificaції вводили Н-тімідін в дозі 2 МБк/100 г маси тіла. Кількість ДНК визначали методом Тангауера і Шмідта в модифікації [Трудобובה М. Г., 1977]. Питому радіоактивність ДНК виражали в імп/хв/мг ДНК.

Для отримання мічених кейлонів тваринам вводили С-білковий гідролізат хлорели в дозі 20 МБк на 100 г маси тіла тварини. Експозиції з кейлонами складали від кількох годин до кількох діб.

Фракційний склад, кількість окремих компонентів кейлонів, виділених з печінки, визначали за допомогою електрофорезу в ПААГ і гель-фільтрацією на колонці з сефадексом G-75 [Остерман Л. А., 1981; 1985].

При визначенні тканинної локалізації кейлонів використовували мічену С фракцію, що містить кейлон, з високою питомою активністю, яку вводили одномісячним щурам внутрішньочеревинно в дозі 45 мг на 100 г маси тіла тварини. Після цього через 15, 30, 60 хвилин і 3, 6, 12 годин в крові, печінці, легенях, серці і селезінці тварин визначали вміст С-кейлонів [Оврина Р. Д., 1979]. Одержані результати виражали в імп/мл сировини чи в імп/г тканини.

Для вивчення механізму дії кейлонів використовували метод визначення вклучення мічених попередників в білки ядер, і РНК. Ядра виділяли згідно [Schneider V. C., Hogeboom G. H., 1951]. Білки ядер розділяли екстракцією [Збарский И. Б., 1967]. Рибосоми виділяли методом [Клеменс М., 1987]. Питому радіоактивність гістонів і негістонових білків виражали в імп/мг білка.

Дію кейлонів при багаторазових введеннях досліджували

на одномісячних тваринах, яким на протязі 7 діб двічі (о 8 і 20 годинах) вводили кейлони по 15 мг на 100 г маси тіла.

Результати обробляли методом варіаційної статистики за допомогою критерія Стьюдента.

#### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ І ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Характеристика фракції кейлонів на різних етапах онтогенезу. Дослідження за допомогою електрофорезу в ПААГ виділеної нами з печінки інтактних щурів фракції, що містить кейлон, показали, що вона представлена білками з різною молекулярною масою. Вони розподіляються за допомогою диск-електрофорезу в ПААГ на 9-10 компонентів з молекулярною масою від 17 до 100 КДа, що угадується з даними інших авторів [Окулов В. В., Кетлинский С. А., 1975]. Нами показано, що кількість електрофоретичних зон, їх рухливість в ПААГ не залежить від віку піддослідних тварин.

Подальше фракціювання на колонці з сефадексом G-75 дозволило розділити її на 4 компоненти, означені як I, Ia, II, III. Відомо, що саме низькомолекулярною фракцією III визначається найсильніший пригнічувальний ефект кейлонів [Кетлинский С. А., Парфенова Е. В., 1981]. Кількісні дослідження цієї фракції у тварин різних вікових груп показали, що з віком вона збільшувалася, досягаючи найвищого рівня у старих тварин (3,7 %, 5,5 %, 8,2 %, 11,2 % вмісту у тварин 1-, 3-, 12- і 24-місячного віку відповідно).

З літературних даних відомо, що регенерація супроводжується появою стимуляторів клітинного ділення [Бала Ю. М., 1984]. Однозначного уявлення про механізм дії і взаємодії стимуляторів і інгібіторів як в процесах онтогенезу, так і при регенерації, немає.

Дослідження, проведені нами для вивчення складу (гетерогенності) кейлонів, виділених з печінки, що регенерує, дозволили встановити, що гетерогенність їх білкових компонентів, починаючи з 12 годин і до 28 діб, не змінюється, якщо оцінювати її за числом наявних зон. Певне, визначальними в процесі відновлення маси печінки є якісні зміни факторів регуляції проліферації клітин.

Вивчення активності інгібіторів проліферації на різних етапах онтогенезу і на різних експериментальних моделях.

Стан кейлонної системи при старінні тканин вивчений не-

достатньо.

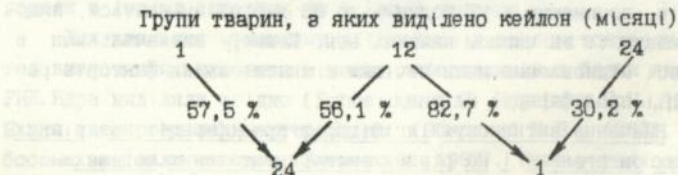
Оскільки вікова динаміка чутливості клітин до кейлонів невідома, нами на моделі печінки, що регенерує, була вивчена чутливість клітин до кейлонів на різних етапах онтогенезу щурів.

Попередньо була проведена робота по а'ясуванню часу максимального синтезу ДНК в печінці гепатектомованих тварин різних вікових груп. Одержані результати показали, що швидкість включення мічених попередників у ДНК досягає максимуму у ставонеарілих (1 міс) і молодих (3 міс) щурів на 24-у годину, а у дорослих (12 міс) і старих (24 міс)-на 26-у годину після часткової гепатектомії.

Показником чутливості клітин до кейлонів у наступній серії експериментів стало визначення питомої радіоактивності ДНК після внутрішньочеревинного введення кейлонів тваринам рівного віку. Результати, одержані нами, показали високий ступінь інгібіції питомої радіоактивності ДНК у тварин 1,3 і 12-міс. віку (87,2  $\pm$  2,2%; 76,2  $\pm$  3,8%; 84,6  $\pm$  3,4%). У тварин в віці 24 міс. ступінь інгібіції питомої радіоактивності ДНК значно нижчий у порівнянні з тваринами більш молодого віку (56,2  $\pm$  8,4%).

На підтвердження цих результатів свідчать дані, отримані нами при введенні кейлонів, виділених у одномісячних тварин, старим (24 міс) і навпаки. Виявилось, що кейлони з печінки одномісячних щурів пригнічують синтез ДНК в печінці 24-міс. щурів на 57,5 %, в той час як при зворотній моделі досліду (кейлони із печінки старих тварин вводили одномісячним) пригнічувальний ефект складав лише 30 %. Інгібітори, виділені в печінки 1 і 12-місячних щурів, проявляють на синтез ДНК в клітинах печінки старих тварин однакову дію (див. схему).

Схема. Пригнічувальна дія кейлонів, що виділені в печінки щурів різного віку, на інтенсивність проліферації



Тварини, на яких тестувалася активність кейлонів (місяці)

На базі цих даних є підстави зробити висновок про те, що чутливість клітин печінки старих тварин до пригнічувальної дії кейлону зменшується, а також знижується активність самих кейлонів з віком. Найменший ефект пригнічення проліферації у 24-міс. щурів може обумовлюватися як віковою зміною пригнічувальної активності кейлонів, так і віковою зміною популяції гепатоцитів, які можуть мати різну чутливість до кейлонів.

З даних літератури відомо, що під час регенерації спостерігається тимчасове зникнення як чутливості клітин-цілей до дії інгібіторів, так і їх біологічної активності.

Проведене нами вивчення функціональної активності кейлонів, виділених з печінки, яка регенерує, дозволяє зробити висновок, що кейлонна активність при регенерації органа не зникає цілком, хоч дещо зменшується у порівнянні з активністю кейлонів інтактної печінки.

Можна припустити, що в тканинах з викликаню проліферацією частка клітин, яка синтезує інгібітор, зменшена.

Аналізуючи ці твердження, важливо зупинитися на впливі гормонального статусу організму на дію кейлонів. Відомо, що глюкокортикоїди пригнічують ділення клітин [Епифанова О. И., 1965].

В ряді досліджень показано також, що свій ефект кейлони реалізують шляхом взаємодії з гормонами [Bullough W. S., Laurence E. B., 1968]. Зокрема, встановлено, що адреналін і гідрокортизон в значній мірі підсилюють вплив печінкового і ниркового кейлонів [Chopra D. P., 1973; Мамонтов С. Г., 1982]; для прояву дії кейлона печінки велику роль відіграє певний рівень гормонів кори наднирників у крові [Никитин В. Н., Блок Н. Н., 1980].

Приймаючи до уваги результати цих робіт, ми дослідили окремий і сукупний вплив гідрокортизону і кейлонів на проліферацію клітин печінки на моделі викликаню проліферації.

Виявилось, що сукупна дія гормону і кейлонів справляє значно більший ефект пригнічення проліферації, ніж їх окрема дія.

Цей факт доводить, що гормони модулюють реалізацію біологічного ефекту кейлонів. Враховуючи, що з віком змінюється гормональний статус організму [Никитин В. Н., 1977], логічно

припустити, що це до деякої міри буде впливати на дію кейлонів, і цим можна пояснити виявлені нами вікові особливості дії цих сполук.

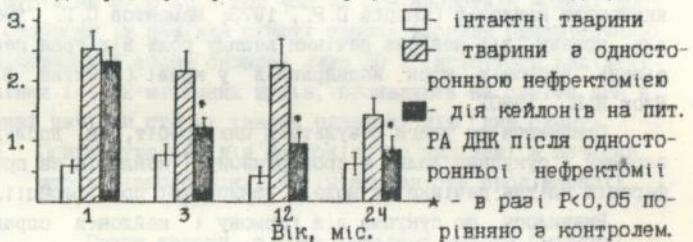
Можна думати, що вікова зміна популяції гепатоцитів і зміна гормонального статусу організму складають вплив на дію кейлонів, що проявляється в зниженні чутливості до їх дії гепатоцитів 24-місячних щурів.

Оскільки клітини різних тканин мають різну здатність до проліферації, логічно припустити, що й кейлонна регуляція проліферації в різних тканинах має свою специфіку.

Проведене нами вивчення динаміки синтезу ДНК в клітинах гіпертрофованої нирки (після односторонньої нефректомії) показало, що при відновленні маси нирки включення мічених попередників в ДНК починається через 18 годин після операції. На 32-у годину цей показник виходить на плато і до 52-ої години після операції практично залишається на цьому рівні, на відміну від печінки, де чітко простежується утворення піків синтезу ДНК у тварин всіх вікових груп.

Вікова характеристика активності кейлонів різна для тварин різного віку. В той час, як у печінці кейлони пригнічували питому радіоактивність ДНК у одномісячних тварин на 82 %, то в нирках цих щурів вони не впливали на синтез ДНК, і лише в 3-місячного віку вони пригнічували реплікацію (мал. 1).

Мал. 1 Вплив кейлонів нирок щурів на питому радіоактивність ДНК у тварин різного віку (імп.  $\times 1000$ /хв. мг ДНК).



Отже встановлено, що з віком відбувається зниження і чутливості тканин-цільей до пригнічувальної дії кейлонів, і активності самих кейлонів, виділених з інтактною печінки.

Активність кейлонів, виділених з печінки, яка регенує, була нижчою у порівнянні з активністю їх з інтактною печінки. Гідрокортизон підсилював пригнічувальний ефект кейлонів на проліферацію клітин печінки. Вікова характеристика

активності кейлонів рiана для рiзних тканин.

Вивчення можливих механiзмiв дiї кейлонiв.

Аналіз даних літератури про функціональну роль кейлонів показує, що максимальний ефект пригнічення проліферації кейлонами виявляється через 2-8 годин після їх введення в організм [Романов Ю. А. та ін. 1984]. Однак наші дослідження показують також, що пригнічення проліферації кейлонами, хоч дещо і в меншій мірі, проявляється і через 23 години після введення кейлонів (вводили через годину після ЧГЕ). Важливо, що на тлі дії кейлонів відсутній пік синтезу ДНК, властивий S-періоду клітинного циклу контрольного варіанту. Все це може свідчити про те, що фракція, яка вміщує кейлони, призводить до асинхронності проходження гепатоцитами печінки, що регенерує, S-періоду клітинного циклу, з одного боку, і про те, що дія кейлонів не така короткочасна, як вважають деякі автори. При стимуляції нового клітинного циклу відбувається зняття кейлонного блоку.

При визначенні тканинного розподілу ін'єксованої експериментальним тваринам фракції, що містить мічений кейлон, нами встановлено, що радіоактивна мітка виявляється в основному в печінці (де вона залишається на протязі всього досліджу, аж до 12 годин) і сироватці крові, в той час, як селезінка, легені і серце не зв'язували мічені молекули інгібітора. Ці дані вважають на тканинну специфічність дії кейлонів і підтверджують результати про їх тривалу дію.

Таким чином, на основі наших досліджень на моделі індукованої проліферації печінки частковою гепатектомією, правомірно зробити висновок про тривалу дію кейлонів (не менш, як 12-23 години) з максимальним ефектом активності через 8 годин після одноразового введення в організм.

Маючи на увазі факт тривалого ефекту кейлонів у клітині, можна зробити висновок, що по-перше, кейлони діють на проходження S-періоду клітинного циклу опосередковано через інші метаболічні ланки, зокрема синтез білків хроматину (гістони, негістонові білки), які синтезуються до початку синтезу ДНК [Божков А. Й. та ін., 1980], по-друге - зберігаючи свою активність доволі довго, кейлони можуть діяти як інгібітори клітинної проліферації і в момент настання S-періоду клітинного циклу, тобто вони діють безпосередньо на синтез ДНК.

Проведені нами дослідження впливу фракції, що містить

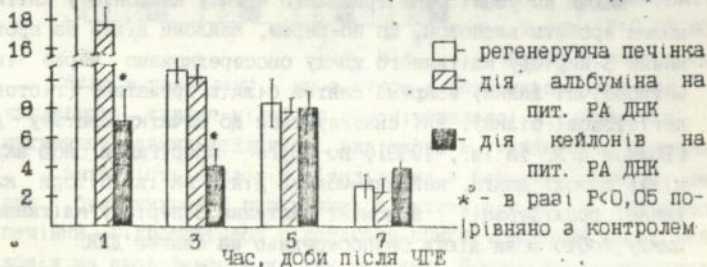
кейлон, на питому радіоактивність гістонів і негістонових білків хроматину показали, що швидкість синтезу цих хромосомальних білків здійснюється з тією ж інтенсивністю, як і в контролі. Ці результати дозволяють вважати що кейлони реалізують свою дію не на рівні аміни процесів біогенезу хроматину, а безпосередньо, діючи на рівень реплікативних процесів.

Таким чином, на підставі цієї серії дослідів можна зробити висновок, що кейлони печінки після одноразового введення в організм зв'язуються з гепатоцитами, де вони утримуються не менше 12 годин. Кейлони не впливають на синтез білків хроматину, а їх дія в клітині реалізується безпосередньо на рівні синтезу ДНК (знижує питому радіоактивність ДНК в 3-4 рази після одноразового введення). Максимальна активність кейлонів печінки проявляється при введенні їх за 8 годин до настання S-періоду клітинного циклу, але вона зберігається високою на протязі 23 годин до настання піку синтезу ДНК після ЧГЕ.

При одноразовому введенні кейлонів не можна зробити висновок про те, чи вони здійснюють тимчасову затримку синтезу ДНК, чи їх дія призводить до тривалого пригнічення проліферації. Відповідь на це питання має принципове значення для дослідження механізмів дії кейлонів. У зв'язку з цим ми дослідили вплив багаторазового введення кейлонів на динаміку синтезу ДНК в ході відновлення маси печінки після часткової гепатектомії.

Проведені дослідження показали, що величина питомої радіоактивності ДНК в контрольній печінці, що регенерує, зменшувалася з 1 до 7 діб в 10 разів (мал. 2).

Мал. 2. Дія багаторазового введення кейлонів на питому радіоактивність ДНК в клітинах печінки щурів (імп. x 1000 хв. мг ДНК).



Встановлено, що багаторазове введення кейлонів (двічі на добу, о 8-й і о 20-й годині) не приводить до підсилення пригнічення синтезу ДНК. Навпаки, на 7-й тиждень після часткової гепатектомії, коли практично завершується процес відновлення маси печінки у контролі, на тлі дії кейлонів спостерігається навіть деяке збільшення питомої радіоактивності ДНК печінки щодо контролю. Отже, навіть при дворазових щоденних введеннях кейлонів пригнічення питомої радіоактивності ДНК проявлялося лише в перший пік синтезу ДНК, а в подальшому гепатоцити виявлялися нечутливими до дії кейлонів.

Таким чином, проведені дослідження дозволили прийти до висновку, що основна маса кейлонів, введених в організм, зв'язується в печінці, де вони утримуються не менше 12 годин. Кейлони асинхронно затримують проходження гепатоцитами S-періоду клітинного циклу, що приводить до "згладжування" піку синтезу ДНК в цьому періоді. Зняття кейлонного блоку, очевидно, здійснюється при новій індукції клітинного циклу. Дія кейлонів направлена на окрему популяцію гепатоцитів і характеризується тривалим виключенням їх з циклу, що очевидно, призводить до входження в цикл нової популяції гепатоцитів, резистентної до дії кейлонів.

#### ВИСНОВКИ

1. Фракція, що містить кейлони (виділена спиртовим осадженням), гетерогенна за складом і представлена 9-10 білковими компонентами з молекулярними масами від 17000 до 100000 Да. Кількість електрофоретичних зон в поліакриламідному гелі залишається незмінною в онтогенезі. Індукція проліферації клітин печінки частковою гепатектомією не приводить до зміни електрофоретичної характеристики кейлонів печінки.

2. Кількість низькомолекулярної фракції кейлонів (17КДа, яким властива найбільша пригнічувальна активність щодо проліферації), виділеної хроматографією на сефадексі, збільшується в віком тварин від 3,7 % у 1-місячних до 11,2 % у 24-місячних щурів.

3. Максимум синтезу ДНК у 1- і 3-місячних щурів наступає раніше (24 години після ЧГЕ), ніж у 12- і 24-місячних (28 годин після ЧГЕ), що свідчить про те, що на ранніх етапах онтогенезу клітинний цикл відбувається швидше. Чутливість гепатоцитів до кейлонів у старих (24-місячних) щурів була

нижчою, ніж у молодих і дорослих тварин при оцінці її по впливу кейлонів на швидкість синтезу ДНК гепатоцитів. Активність кейлонів знижувалася з 3 до 24-місячного віку щурів. Активність кейлонів, виділених з печінки, що регенерує, була нижчою, ніж тих, що виділені з інтактноі печінки.

4. Спільне введення фракції, що містить кейлон, і гідрокортизону підсилює ефект пригнічення проліферації клітин кейлонами.

5. Вікова характеристика активності фракції, яка містить кейлон, різна для різних тканин. В той час, як у печінці кейлони пригнічували питому радіоактивність ДНК у 1-місячних тварин на 82 %, то в нирках вони не пригнічували синтезу ДНК в цьому віці, і лише, починаючи з тримісячного віку, вони пригнічували реплікацію.

6. Кейлони печінки специфічно зв'язуються з клітинами печінки і утримуються там не менше 12 годин, що свідчить про їх пряму специфічну дію на клітину-ціль.

7. Максимальна пригнічувальна активність кейлонів на проліферацію клітин печінки виявлялася через 4-8 годин після їх одноразового введення в організм, однак їх активність зберігалася на високому рівні достатньо (не менше, як 23 години). Після багаторазових введень фракції, що містить кейлон, гепатоцити втрачали чутливість до дії цих інгібіторів.

8. Кейлони не впливали на швидкість синтезу гістонів і негістонових білків, а діяли безпосередньо на синтез ДНК.

#### ПУБЛІКАЦІЇ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Шенцева Е. А., Шевцова М. Я., Мальшев А. В., Никитин В. Н. Динамика проліферації кліток почек крыс и влияние на нее эндогенных ингибиторов // Булл. експер. биол. и мед. М.: Медицина, 1993. - №5. - С. 523-525.

2. Шевцова М. Я., Шенцева Е. А., Клименко А. И., Мальшев А. В. Активность ингибиторов пролиферации G-2 клеток печени белых крыс в онтогенезе и при воздействии гидрокортизона // Проблемы старения и долголетия. - Киев: Наук. думка, 1993. - Т. 3, №1. - С. 24-29.

3. Божков А. И., Шенцева Е. А., Шевцова М. Я., Мальшев А. В., Скляр А. И. Влияние кейлонсодержащей фракции печени на прохождение S-периода клеточного цикла в регенерирующей печени // Биохимия. - 1995. - Т. 60, вып. 4. - С. 620-627.

4. M. Y. Shevtzova, A. B. Malyshev, E. A. Shentzeva, A. I. Bozhkov, A. I. Klimenko. The activity of proliferation inhibitor G-1 liver cells of albino rats of different age under conditions of regeneration and growth-retarding diet // School of Fundamental Medicine Journal. - Харьков: Изд-во Основа, 1995. - №1. - С. 45-48

Б. Вожков А. И., Е. А. Шенцева, М. Я. Шевцова, А. В. Мальшев, М. К. Асадова, член-кор. АН Украины А. М. Белоус. Кейлоны влияют на степень синхронности прохождения S-периода клеточного цикла гепатоцитами регенерирующей печени // Докл. акад. наук Украины. - Серия Б. - 1994. - №6. - С. 128-130.

Б. Мальшев А. В., Шевцова М. Я., Шенцева Е. А. Активность ингибиторов пролиферации в клетках нормальной и регенерирующей печени в онтогенезе // Биологические механизмы старения: Тез. докл. - Харьков, 1994. - С. 100.

Shentzeva H. A. Age peculiarities of chalone regulation of liver cell proliferation.

The thesis on competition for scientific degree of candidate of biological science on speciality 03.00.13 - Human and animal physiology. Kharkov State University, Kharkov, 1995.

10 scientific works, which contain the theoretical and experimental investigations of state of chalone system in ageing aspect are defending.

It was shown that quantitative (increasing of lowmolecular fraction of chalones that had most pronounced effect) and qualitative changes took place in onthogenesis, the inhibitory activity decreased as in normal liver as in regenerating one. Susceptibility of hepatocytes to chalone action also decrease with age. Simultaneous injection of hydrocortisone intensifies the inhibitory effect of chalones. Age system of chalone regulation has particular tissue feature: chalones inhibit the incorporation of label into liver DNA on 1 month old animal, but they inhibit synthesis of kidney DNA only from 3 month old age. It was shown activity liver chalones may preserve at high level for a long time, at least 23 hours. It was revealed that after injection of chalones into organism they quickly connected with liver cells and kept there at least 12 hours. The most pronounced effect of chalones was observed after their singular injection into

organism. Multiple subsequent injection of chalones into organism is accompanied by loss of susceptibility of hepatocytes to their inhibitors.

Шенцева Е. А. Возрастные особенности кейлонной регуляции пролиферации клеток печени крыс.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.13 - Физиология человека и животных. Харьковский госуниверситет, Харьков, 1995.

Защищается 10 научных работ, которые содержат теоретические и экспериментальные исследования состояния кейлонной системы в возрастном аспекте.

Показано, что в процессе онтогенеза происходят как количественные (увеличивается низкомолекулярная фракция кейлонов, обладающая наиболее выраженным ингибиторным эффектом), так и качественные изменения, снижается их активность как в интактной, так и в регенерирующей печени. Чувствительность гепатоцитов к действию кейлонов также снижается с возрастом. Совместное введение кейлонов и гидрокортизона усиливает ингибирующий эффект кейлонов. Возрастная система кейлонной регуляции имеет выраженную тканевую особенность: если в печени кейлоны подавляли удельную радиоактивность ДНК, начиная с 1-месячного возраста животных, то в почках они ингибируют синтез ДНК только с 3-месячного возраста. Показано, что активность кейлонов печени может сохраняться на высоком уровне достаточно долго, не менее 23 ч., обнаружено, что после введения кейлонов в организм они быстро связываются с клетками печени и удерживаются там не менее 12ч. Наиболее выраженный эффект действия кейлонов наблюдается при их однократном введении в организм. Многократное последовательное введение кейлонов в организм сопровождается потерей чувствительности гепатоцитов к этому ингибитору.

Ключові слова: кейлони, регенерація, проліферація, інгібітор, мітотичний цикл (МЦ), часткова гепатектомія (ЧГЕ), гепатоцит, нирка, питома радіоактивність (ІР), онтогенез.

ЛНБ ім. В. Стефаники  
АН України

Підп. до друку 01.09.95. Формат 60x84<sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Папір друк. А2. Друк офсетний. Умовн. друк. арк. 10.  
Облк.-вид. арк. 1,0. Тираж 100 прим. Зам. 4222. Безплатно.

---

Поліграфічна фірма «Прінтал»  
310093, Харків, вул. Свердлова, 115.



443212

AB 33.189

**AB 33.189**