

УДК 616.36-002:599.323.4

ВПЛИВ ІНСУЛІНОПОДІБНОГО ФАКТОРА РОСТУ-1 НА ПРОЦЕСИ РЕПАРАТИВНОЇ РЕГЕНЕРАЦІЇ ПЕЧІНКИ У ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ ЗА УМОВ ХРОНІЧНОЇ АЛКОГОЛЬНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ**Рикало Н.А., Яровенко Л.О.***Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова,
кафедра патологічної фізіології, м. Вінниця, Україна*

У статті досліджували вплив IGF-1 на процеси репаративної регенерації печінки у щурів різного віку при хронічному алкогольному ураженні печінки та за умов корекції кверцетином та L-аргініном L-глутаматом. Установлено, що у всіх вікових групах IGF-1 стимулює процеси репаративної регенерації тканини печінки, впливаючи на фази клітинного циклу, активуючи перехід ядер гепатоцитів з фази спокою до мітозу та забезпечує проліферацію клітин печінки. Встановлено, що найвищий рівень IGF-1 відмічено у старих щурів, оскільки в них найвищий рівень фрагментації ядерної ДНК, що призводить до значної загибелі гепатоцитів та активації компенсаторної регенерації, таким чином даний вік є найчутливіший до токсичної дії етанолу. Доведено, що введення L-аргініну L-глутамату в порівнянні з кверцетином, у тварин усіх вікових груп більш позитивно впливає на процеси репаративної регенерації, а отже і на функціональний стан печінки.

Ключові слова: *інсуліноподібний фактор росту-1, репаративна регенерація, печінка.*

Вступ

Печінка, як відомо, є одним з небагатьох органів, здатних відновлювати початковий розмір навіть при збереженні всього лише 25 % нормальної тканини. Регенерація печінки – складний компенсаторний процес відновлення маси і функції органу внаслідок необоротного ушкодження або механічного видалення частини його паренхіми [1]. Вважається, що за відсутності стимуляції росту гепатоцити протягом життя діляться один або два рази. Однак після пошкодження будь-якої етіології або видалення фрагмента печінки запускається послідовний механізм, основними компонентами якого є проліферація, диференціювання і міграція клітин, а також реструктуризація строми і ангиогенез [2]. Фактори, які продукуються печінкою та позапечінковими тканинами, взаємодіючи між собою та зі специфічними рецепторами клітинних мембран, регулюють даний механізм [3].

Здатність диференційованих клітин печінки до самопідтримки протягом всього життя організму дозволяє кваліфікувати гепатоцити як уніпотентну популяцію стовбурових клітин. Разом з тим доказано існування в печінці і факультативних стовбурових клітин, до яких відносяться недеференційовані клітини, які знаходяться в системі жовчних проток (клітини каналів Герінга). Їх найближчі нащадки, овальні клітини, можуть дати початок декільком клітинним лініям, в тому числі гепатоцитам та клітинам жовчного епітелію [4]. Крім того, в дослідженнях *in vitro*, була показана можливість розвитку гепатоцитів і овальних клітин зі стовбурових клітин кісткового мозку, які функціонально є мультипотентними, здатними до самовідтворення при симетричному діленні і дають початок клітинам-передникам при асиметричному розподілі, але це належним чином не було ідентифіковано *in vivo* [5]. Якщо

самовідновлення є унікальною властивістю стовбурових клітин, то клітини-попередники, які є їх нащадками, проліферують і диференціюються в соматичні популяції, але самі не зберігаються. Вони можуть мати одно- або мультилінійний потенціал, але здатні тільки до короткочасної перебудови тканини [6]. Вивчення та дослідження механізмів, які зумовлюють дані процеси, є актуальним питанням сучасної біології та медицини. На сьогодні, зібраний великий матеріал про біохімічні процеси, які відбуваються в печінці під час її регенерації, однак залишається ще низка питань, які висвітлені не повністю та викликають інтерес науковців. Актуальним питанням є стимуляція репаративної регенерації патологічно зміненої печінки і дослідження її клітинних механізмів.

Мета: Дослідити вплив IGF-1 на процеси репаративної регенерації печінки у щурів при хронічному алкогольному ураженні печінки (ХАУП) та за умов корекції, враховуючи вікові особливості.

Матеріали та методи

Для роботи використовували 120 самок білих лабораторних щурів, які були розподілені на 3 вікові групи: I група – статевонезрілі (1,5 міс., n=40); II група – молоді статевозрілі (6 міс., n=40); 3 група – старі тварини (20 міс., n=40). Дані групи в свою чергу були поділені на наступні 4 підгрупи по 10 тварин в кожній: 1 – інтактні тварини; 2 – тварини з ХАУП, яке моделювали за методикою Г.А. Ковальова та А.Ю. Петренка (2004) [7]; 3 – тварини з ХАУП при корекції кверцетином (100мг/кг); 4 – тварини з ХАУП при корекції L-аргініном L-глутаматом (35 мг/кг). Перерахунок ЕД для кверцетину та L-аргініну L-глутамату проводили за методикою Ю.Р. Риболовлева [8].

Для визначення активності проліферативних, поліплоїдизаційних та гіпертрофічних процесів у гепатоцитах використовували метод проточної цитометрії. Дослідження проводилось на базі НДЦ ВМУ ім. М.І. Пирогова на багато-

функціональному науково-дослідному проточному цитометрі «Partec PAS» фірми Partec (Німеччина). Після виведення тварин з експерименту негайно вилучили печінку. В стерильних умовах зі свіжого матеріалу вирізали шматочок тканини печінки, який негайно промивали стерильним 0,9 % NaCl та поміщався у фосфатно-сольовий буфер pH 7,4 (Sigma) при температурі 4-8 °C. Суспензії ядер з клітин печінки одержували за допомогою набору «CyStainDNA» фірми «Partec» (Німеччина) відповідно до протоколу-інструкції виробника. Імуноферментним методом на аналізаторі Humareader 2106 (США) за допомогою набору реактивів «DRG» (Німеччина) визначали плазмовий вміст IGF-1. Статистичні аналізи проводили за комп'ютерною програмою Microsoft Excel XP. Достовірною вважали ймовірність $p < 0,05$, для її визначення використовували непараметричний U-критерій Манна-Уїтні.

Обговорення результатів дослідження

Проведене дослідження показало, що у щурів всіх вікових груп за умов ХАУП вміст IGF-1 зменшується у порівнянні з ідентичними за віком контрольними показниками, оскільки етанол та його метаболіти мають токсичну дію на тканину печінки зі зниженням функціональних властивостей. Найнижчий рівень IGF-1 був у статевонезрілих щурів (контрольні значення та з ХАУП), а найвища концентрація IGF-1 була у старих щурів, як в нормі, так і за умов ХАУП, однак слід відмітити, що чутливість тканин до доного цитокіну з віком зменшується, тому в даній групі найбільший рівень ушкодження печінки. При лікувально-профілактичному введенні кверцетину та L-аргініну L-глутамату вміст IGF-1 збільшувався, однак значення при застосуванні кверцетину так і не досягали контрольних значень, а при корекції L-аргініну L-глутамату у щурів 1 та 3 групи навіть перевищують контрольні значення ідентичних за віком тварин, що опосередковано вказує на посилення репаративної регенерації тка-

нини печінки, оскільки з літературних даних відомо, що IGF-1 сприяє збільшенню утворення фактора росту гепатоцитів зірчастими клітинами печінки та стимулює процеси регенерації печінки [9]. Оскільки важливими показниками регенерації тканини печінки є фази клітинного циклу, нами проведено дослідження кореляційних зв'язків між IGF-1 та змінами показників клітинного циклу в щурів при ХАУП та при медикаментозній корекції у трьох вікових групах. Доведено, що за умов ХАУП відсоток ядер клітин печінки, які знаходяться в фазі G_0G_1 зменшується у 1 групі на 3,1 % ($p < 0,05$), у 2 групі – на 7,6 % ($p < 0,05$), та у 3 групі – на 4,2 % ($p < 0,05$), у порівнянні з інтактом, що вказує на пошкодження гепатоцитів, що також може призводити до збільшення відсотка ядер гепатоцитів, які перебувають в періоді $Sub-G_1$ та може вказувати на загибель гепатоцитів шляхом апоптозу, оскільки збільшується фрагментація ядерної ДНК гепатоцитів: у 1 групі на 21,7 % ($p < 0,01$), у 2 групі на 39,5 % ($p < 0,01$) та у 3 групі на 70,7 % ($p < 0,05$), що вказує на високий ступінь ушкодження печінки.

Також доведено при ХАУП відбувається зниження відсотка ядер гепатоцитів, які перебувають у фазі S в 1 групі на 56,2 % ($p < 0,05$), у 2 групі на 51,9 % ($p < 0,05$) та у 3 групі на 56,5 % ($p < 0,05$), тобто синтетичні процеси в ядрі зменшуються при дії етанолу. Однак збільшується відсоток ядер клітин печінки, які перебувають у фазі G_2M , а саме у 1 групі на 26,7 % ($p < 0,05$), у 2 групі – на 53,1 % ($p < 0,05$) та у 3 групі – на 46,7 % ($p < 0,05$) у порівнянні з інтактом, що можна трактувати як своєрідну компенсаторну реакцію зі збільшенням клітин які перебувають у мітозі та посилення репаративної регенерації тканини печінки (найвища у молодих тварин) при хронічній дії етанолу. При медикаментозній корекції кверцетином та L-аргініном L-глутаматом встановлено нормалізацію перерахованих показників, що вказує на високі гепатопротекторні властивості препаратів.

При аналізі кореляційних зв'язків між IGF-1 та клінічним циклом клітин печінки, встановлено, що при ХАУП рівень IGF-1 корелює з відсотком ядер гепатоцитів, які перебувають в фазі G_0G_1 (у 1 групі $r = -0,45$; у 2 групі $r = -0,55$), у фазі G_2M (у 1 групі $r = 0,67$; у 2 групі $r = 0,55$), у фазі S (у 1 групі $r = 0,87$; у 2 групі $r = -0,68$; у 3 групі $r = 1,0$), $p > 0,05$. При корекції кверцетином встановлено, у 1-ій групі сильний кореляційний зв'язок IGF-1 з відсотком ядер гепатоцитів, які перебувають у фазі S ($r = -1,0$) та у фазі G_2M ($r = 0,7$), у 2-ій групі з фазою S ($r = -0,7$), фрагментацією ядерної ДНК гепатоцитів ($r = -0,9$) та середньої сили у 3-ій групі між IGF-1 та фазами G_0G_1 , G_2M ($r = -0,6$) та $Sub-G_1$ періодом клітинного циклу. Так, за умов корекції L-аргініном L-глутаматом доведено, що у 1-ій групі тварин IGF-1 має сильний прямий кореляційний зв'язок з відсотком ядер, які перебувають у фазі S ($r = 0,9$) та середньої сили з фазами G_0G_1 ($r = 0,6$) та G_2M ($r = -0,6$), у 2-ій групі слабкий зв'язок з $Sub-G_1$ ($r = -0,46$) та у 3-ій групі сильний прямий кореляційний зв'язок з фазою G_0G_1 ($r = 0,82$) та обернений з фазами G_2M та $Sub-G_1$ ($r = -0,82$), $p > 0,05$, що вказує на ефективність препаратів, доводить їх проліферативний ефект та активацію репаративної регенерації тканини печінки. При порівнянні гепатопротекторних властивостей, можна відмітити більш позитивний ефект L-аргініну L-глутамату на рівень IGF-1 та нормалізацію відсотка ядер гепатоцитів, які перебувають у фазах G_0G_1 , G_2M та достовірно зменшуючи фрагментацію ядерної ДНК клітин печінки при лікуванні ХАУП, незалежно від віку.

Висновки

1. Найвищий рівень IGF-1 відмічено у 3 групі щурів, оскільки в них найвищий рівень фрагментації ядерної ДНК, що призводить до загибелі гепатоцитів та активації компенсаторних репаративних процесів печінки.
2. Установлено, що у всіх вікових групах IGF-1 стимулює процеси репаративної регенерації тканини печінки,

впливаючи на фази клітинного циклу, активуючи перехід ядер гепатоцитів з фази спокою до поділу та забезпечує проліферацію клітин печінки у всіх вікових групах.

3. Введення L-аргініну L-глутамату, незалежно від віку тварин більш позитивно впливає на печінку, призводить до збільшення рівня IGF-1 у плазмі крові та активує процеси репаративної регенерації патологічно зміненої тканини, забезпечуючи відновлення функціонального стану печінки.

Література

1. Оболенська М.Ю. Регенерація печінки у щурів: молекулярно-біологічні процеси, їх регуляція та часова шкала. Автореф. дис. доктора біол. наук: 03.00.03 / М.Ю. Оболенська; НАН України. Інститут молекулярної біології і генетики. — К., 1999. — 34 с.
2. Furnus C.C., Inda A.M., Andrini L.B. et al. Chronobiology of the proliferative events related to angiogenesis in mice liver regeneration after partial hepatectomy // *Cell Biol. Int.* – 2003. – Vol. 27, N 4. – P. 383–386.
3. Fausto N., Campbell J.S., Riehle K.J. Liver regeneration // *Hepatology.* – 2006. – Vol. 43, N 1. – P. 45–53.
4. Фактор В.М., Радаева С.А. Стволовой резерв печени // *Онтогенез.* – 1991. – Т. 22, № 2. – С. 181–189.
5. Heo J., Factor V.M., Uren T. et al. Hepatic precursors derived from murine embryonic stem cells contribute to regeneration of injured liver // *Hepatology.* – 2006. – Vol. 44, N 6. – P. 1478–1486.
6. Oertel M., Shafritz D.A. Stem cells, cell transplantation and liver repopulation // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – Vol. 1782, N 2. – P. 61–74.
7. Ковалёв Г. А. Экспериментальная модель алкогольного поражения печени у самок крыс / Г.А. Ковалёв, А.Ю. Петренко // *Вісн. Харк. нац. унів.* – 2004. – № 617. – С. 15 – 18
8. Рыболовлев Ю.Р. Дозирование веществ для млекопитающихся по константам биологической активности / Ю.Р. Рыболовлев, Р.С. Рыболовлев // *Доклад Академии наук СССР.* – 1979. – С. 1513-1516.
9. Insulin-like growth factor signaling

pathways in rat hepatic stellate cells: importance for deoxybonucleic acid synthesis and hepatocyte growth factor production / S. Skrtic, K. Wallenius, A. Gressner [et al.] // *Endocrinology.* – 1999. – N 140 (12). – P. 5729-5735.

References

1. Obolensky M.Y. 1999, «Liver regeneration in rats: molecular and biological processes and their regulation timeline», Thesis Doctor of Biological Sciences: 03.00.03. National Academy of Sciences of Ukraine. Institute of Molecular Biology and Genetics. K., pp. 34. (in Ukrainian)
2. Furnus C.C., Inda A.M., Andrini L.B., Garcia M.N., Garcia A.L., Badran A.F., Errecalde A.L. 2003, «Chronobiology of the proliferative events related to angiogenesis in mice liver regeneration after partial hepatectomy», *Cell Biol. Int.*, Vol. 27, No 4, pp. 383-386.
3. Fausto N., Campbell J.S., Riehle K.J. 2006, «Liver regeneration», *Hepatology*, Vol. 43, No 1, pp. 45-53.
4. Factor V.M., Radaev S.A. 1991, «Stem reserve liver», *Developmental Biology*, Vol. 22, No 2, pp. 181-189. (in Russian)
5. Heo J., Factor V.M., Uren T., Takahama Y., Lee J.S, Major M., Feinstone S.M., Thorgeirsson S.S., 2006, «Hepatic precursors derived from murine embryonic stem cells contribute to regeneration of injured liver», *Hepatology*, Vol. 44, No 6, pp. 1478–1486.
6. Oertel M., Shafritz D.A. 2008, «Stem cells, cell transplantation and liver repopulation», *Biochim. Biophys. Acta*, Vol. 1782, No 2, pp. 61–74.
7. Kovalev G.A., Petrenko A.Y. 2004. «Experimental model of alcoholic liver injury in female rats», *Visn. Hark. nat. Univ*, No 617, pp. 15 -18. (in Russian)
8. Rybolovlev Y.R., Rybolovlev R.S. 1979, «Dosing agents for mammalian constants biological activity», Report of the Academy of Sciences of the USSR, pp. 1513-1516. (in Russian)
9. Skrtic S., Wallenius K., Gressner A, Jansson J.O. 1999, «Insulin-like growth factor signaling pathways in rat hepatic stellate cells: importance for deoxybonucleic acid synthesis and hepatocyte growth factor production», *Endocrinology*, No 140 (12), pp. 5729-5735.

Резюме

ВЛИЯНИЕ ИНСУЛИНОПОДОБНОГО
ФАКТОРА РОСТА-1 НА ПРОЦЕССЫ
РЕПАРАТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ
ПЕЧЕНИ У КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА
ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ
ИНТОКСИКАЦИИ

Рыкало Н.А., Яровенко Л.А.

В статье исследовали влияние IGF-1 на процессы репаративной регенерации печени у крыс разного возраста при хроническом алкогольном поражении печени и при условии коррекции кверцетином и L-аргинином L-глутаматом. Установлено, что во всех возрастных группах IGF-1 стимулирует процессы репаративной регенерации ткани печени, влияя на фазы клеточного цикла, активируя переход ядер гепатоцитов из фазы покоя к митозу и обеспечивает пролиферацию клеток печени. Установлено, что высокий уровень IGF-1 отмечено у старых крыс, так как в них высокий уровень фрагментации ядерной ДНК, что приводит к значительной гибели гепатоцитов и активации компенсаторной регенерации, таким образом данный возраст является чувствительный к токсическому действию этанола. Доказано, что введение L-аргинина L-глутамата по сравнению с кверцетином, у животных всех возрастных групп более положительно влияет на процессы репаративной регенерации, а следовательно и на функциональное состояние печени.

Ключевые слова: *инсулиноподобный фактор роста-1, репаративная регенерация, печень.*

Summary

INFLUENCE INSULIN-LIKE GROWTH
FACTOR-1 ON THE PROCESS OF
REPARATIVE REGENERATION OF THE
LIVER IN RATS OF DIFFERENT AGES IN
CHRONIC ALCOHOL INTOXICATION

Rykalo N.A., Yarovenko L.A.

The paper studied the effect of IGF-1 on the processes of reparative regeneration of the liver in rats of different ages with chronic alcoholic liver disease and provided correction quercetin and L-arginine L-glutamate. It was established that in all age groups, IGF-1 stimulates the reparative regeneration of liver tissue, affecting the cell cycle phase, activating the transition of nuclei of hepatocytes in the resting phase of mitosis and cell proliferation provides liver. It has been established that high levels of IGF-1 was observed in old rats, as they have a high level of nuclear DNA fragmentation, which results in significant activation of hepatocyte death and a compensatory regeneration, thus this age is sensitive to the toxic action of ethanol. It is proved that the introduction of L-arginine L-glutamate as compared with the quercetin in animals of all ages more positively affect the process of reparative regeneration and the functional state of the liver.

Key words: *insulin-like growth factor-1, reparative regeneration of the liver.*

*Впервые поступила в редакцию 27.04.2015 г.
Рекомендована к печати на заседании
редакционной коллегии после рецензирования*