

Експресія інтерферону α в печінці щурів після часткової гепатектомії

М. М. Перепелюк, Д. Б. Федорченко¹, С. Л. Рибалко¹, М. Ю. Оболенська

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

¹ Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського АМН України
Вул. М. Амосова, 5, Київ, 03680, Україна

Obolenskaya@imbg.org.ua

Досліджено експресію ІФНа/β в печінці щурів після часткової гепатектомії (ЧГЕ) і лапаротомії (ЛАП). Печінку щурів після ЧГЕ і ЛАП використали відповідно як моделі регенераційного процесу та реакції гострої фази у відповідь на пошкодження, яка є складовою регенераційного процесу. Вміст білка ІФНа визначали в сумарному цитозолі клітин печінки за біологічним тестом, а відносний вміст ІФНа- та ІФНβ-специфічних РНК у сумарному препараті РНК печінки — за допомогою зворотної транскрипції і полімеразної ланцюгової реакції. Показано, що в печінці інтактних щурів і щурів після ЧГЕ експресуються ІФНа-специфічна РНК і білок ІФНа. ІФНβ-специфічна РНК не детектується. Надходження ІФНа до печінки з сироватці крові, або визначається в незрівнянно менших концентраціях, ніж у печінці. ЧГЕ спричинює підвищення рівня ІФНа-специфічної РНК і білка впродовж періоду переходу неактивного в проліферативному відношенні органа до проліферації (1–3 год після ЧГЕ) і поступовий спад до початку S-фази першого клітинного циклу гепатоцитів (12 год після ЧГЕ). У кількісному відношенні підвищення експресії ІФНа на початку регенераційного процесу є меншим за максимально можливе, що показано в досліджах із типовим стимулятором синтезу ІФНа, полі(І)-полі(С). ЛАП призводить до повного припинення експресії ІФНа, що виявлено через 1, 3, 6 і 12 год після операції на рівні РНК і білка. Таким чином, підвищена експресія ІФНа на ранньому етапі регенераційного процесу є характерною для перехідного періоду. Експресія ІФНа несумісна з реакцією гострої фази. Значення ІФНа для обох процесів залишається поки не визначеним. Спад у синтезі ІФНа до 12 год після ЧГЕ узгоджується з загальновідомими уявленнями про антипроліферативну активність ІФНа.

Ключові слова: ІФНа, регенерація печінки.

Вступ. Широке використання інтерферону альфа (ІФНа) при лікуванні злоякісних новоутворень, неоднозначний характер його впливу на різних стадіях розвитку пухлин, ускладнення при застосуванні високих доз інтерферону та індивідуальний характер його дії зумовили наш інтерес до продукції ендогенного інтерферону альфа протягом регенераційного процесу та реакції гострої фази.

Як експериментальні моделі обрано печінку щурів після класичної операції часткової гепатектомії (ЧГЕ) та лапаротомії (ЛАП).

Зниження функцій печінки внаслідок хірургічної або функціональної втрати частини органа стимулює відновлення його втраченої маси. У процесі регенерації беруть участь усі клітини органа. Печінка формується з клітин різного походження— паренхімних (гепатоцитів) і непаренхімних (ендотеліальних, клітин Купфера, Pit-клітин, перисину-

соїдальних). Гепатоцити є найбільшими клітинами органа і складають основну його масу. Вони відповідають за тканинспецифічні функції печінки, синтез і секрецію численних білків, наприклад, альбуміну, трансферину, факторів зсідання крові, церулоплазміну, транстиретину, транскобаламіну та ін. Непаренхімні клітини, хоча і причетні до здійснення органом його тканинспецифічних функцій, виконують ще й суто їм властиву клітинспецифічну роль, зокрема, продукують численні медіатори, такі як цитокіни та ейкосаноїди. Мітотичний індекс у клітинах інтактної печінки низький і становить 0,001—0,005 % [1].

Внаслідок мітогенного стимулу клітини печінки переходять від стану спокою в проліферативному відношенні до проліферації. Після ЧГЕ всі клітини печінки послідовно вступають у клітинний цикл і цей процес строго регулюється в часі. Першими проліферацію починають гепатоцити — на 1 добу раніше, ніж непаренхімні клітини [2]. Період від операції до початку синтезу ДНК називається пререплікативним і складається з двох етапів. Перший етап (перехід від проліферативного спокою до клітинного циклу) триває протягом перших 3 год після ЧГЕ. Другий етап (пресинтетичний період першого клітинного циклу гепатоцитів) продовжується приблизно до 12 год після ЧГЕ [3]. За гепатоцитами до проліферації послідовно переходять клітини жовчних протоків, перисинусоїдальні клітини, клітини Купфера і, наостанок, ендотеліальні клітини [1].

Відомо, що необхідною умовою для переходу гепатоцитів із стану проліферативного спокою до клітинного циклу є активація клітин Купфера і продукування ними медіаторів, зокрема, ФНПа, ІІ-1, ІІ-6 тощо [4]. Клітини Купфера здатні продукувати ще один раніше не досліджений після ЧГЕ цитокін — ІФН α/β .

У попередніх наших роботах показано, що після ЧГЕ відбувається короткотривале сходження рибосом з ендоплазматичного ретикулу (ЕПР) [5]. Знаходячись на ЕПР, рибосоми синтезують секреторні білки на відміну від рибосом, які розташовані в цитоплазмі і продукують білки «домашнього господарства». Ми припустили, що тимчасове сходження рибосом з ЕПР спричинює короткочасне зниження рівня продукування специфічних білків, тобто відбувається щось подібне до дедиференціювання. Крім того, в печінці на ранньому етапі регенерації зафіксовано різноспрямовані зміни ак-

тивності 2'-5'-олігоаденілатсинтетази в ядрі і цитоплазмі [5, 6]. Цей фермент є специфічною мішенню для ІФН α і через 2'-5'-олігоаденілати регулює активність РНКазі L. Крім зазначених змін, типових для дії ІФН α , він може також призупиняти транскрипцію деяких послідовностей ДНК через транскрипційний фактор UBF (upstream binding factor) та ініціацію трансляції за рахунок фосфорилування фактора ініціації трансляції eIF-2 альфа. На підставі даних, отриманих нами та іншим авторами, ми припустили, що інтерферон α/β може брати участь у дедиференціюванні гепатоцитів під час їхнього переходу від проліферативного спокою до клітинного циклу.

Регенерація печінки — це складний процес, який включає в себе тканинспецифічні реакції печінки на ушкодження та компенсаторні реакції. До перших належать локальна реакція на травму та системна реакція гострої фази, в якій печінці належить провідна роль [7], до других — підтримання життєво важливих функцій організму меншим числом клітин на фоні перепрограмування клітин і їхньої проліферації до відновлення маси та функції органа [3].

Метою цієї роботи було визначення рівня експресії ІФН α/β в печінці та джерела його походження з використанням трьох експериментальних моделей. Щури після ЧГЕ слугували моделлю для вивчення власне регенерації печінки, щури після лапаротомії — для дослідження тканинспецифічної реакції печінки на ушкодження будь-якої природи і локалізації і щури після введення індуктора інтерферону альфа — дволанцюгової РНК полі(І)-полі(С) — для виявлення максимально можливого рівня синтезу інтерферону у печінці. Щоб з'ясувати джерело походження інтерферону в печінці визначали також вміст ІФН α/β в селезінці і сироватці крові. Селезінку обрано як місце дозрівання та депо формених елементів крові, зокрема, лімфоцитів, що продукують ІФН α/β , а сироватку — як середовище для переносу речовин і функціонування лімфоцитів.

Матеріали і методи. Об'єктами дослідження були печінка, селезінка та сироватка крові інтактних тварин і тварин через 0,5; 1; 3; 6 та 12 год після видалення 2/3 органа, лапаротомії та введення інтактним щурам індуктора ІФН α полі(І)-полі(С). Розчин полі(І)-полі(С) вводили внутрішньочеревинно в концентрації 650 мкг/мл з розрахунку 330 мкг на щура.

Визначення вмісту інтерферону ІФНа/β. Рівень ІФНа/β визначали за резистентністю клітин невриноми гассерового вузла щурів (НГВЩ) до дії вірусу везикулярного стоматиту (ВВС). 10 %-й гомогенат тканин у фізіологічному розчині центрифугували при 3000 g протягом 20 хв. Супернатанти після центрифугування гомогенатів, а також сироватку крові доводили 5 н НСІ до рН 2,0. При такому рН більшість білків, серед яких інтерферон γ, денатурують та інактивуються. Інтерферони α/β залишаються активними. Детрит осаджували при 3000 g упродовж 10 хв. Супернатант нейтралізували 5 н. NaOH до рН 7,6. Суспензію клітин НГВЩ, яка містила $3 \cdot 10^5$ кл/мл, вносили по 200 мкл в 90 лунок 96-лункових планшетів з плоским дном і інкубували за температури 37 °С в атмосфері 5 %-го CO₂ і 70 %-й вологості. Через 1—2 дні, коли клітини утворювали суцільний моношар, культуральне середовище в 70 лунках замінювали на цитозоль у серійних розведеннях (1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280). Для контролю за ростом культури і визначення цитопатичної дози ВВС використовували 4 і 16 лунок відповідно. Подальша інкубація тривала 24 год за температури 37 °С в атмосфері 5 %-го CO₂, після чого в кожен лунку, окрім контрольних, вносили по 100 мкл суспензії ВВС, що відповідало 100 дозам цитопатичної дії.

Кількість інтерферону α/β виражали у відносних одиницях, які відповідали числу, оберненому до розведення цитозолу або сироватки, що викликало 50 % зменшення цитопатичного ефекту ВВС.

Виділення РНК за методом Хомчинського [8]. 100 мг тканини розтирали в порошок у ступці з рідким азотом, перенесли в пробірку (Falkon), додавали 1 мл 4 М GTC-буфера (4 М гуанідинізоціанат, 25 мМ Na-ацетат, рН 7,0, 1 %-й β-меркаптоетанол) для лізису клітин і декілька разів пропускали через ін'єкційну голку діаметром 0,7 мм для фрагментації ДНК. До гомогенату додавали 1/10 об'єму 2 М Na-ацетата, рН 4,0, рівний об'єм водонасиченого фенолу та 1/2 об'єму хлороформу. Вміст пробірки перемішували на вортексі протягом 15 с, охолоджували на льоду (15 хв), центрифугували при 10000 g (15 хв і 4 °С). Після центрифугування РНК перебуває у водній фазі, в той час як ДНК і білки залишаються в інтер- і фенольній фазах відповідно. Водну фазу відбирали, до неї додавали рівний об'єм охолодженого ізопропанолу і ставили в холодильник (-20 °С

на 1—3 год) для преципітації РНК. Суміш центрифугували протягом 1 год при 10000 g, обережно відбирали супернатант і осад двічі промивали 70 %-м етанолом. Після центрифугування впродовж 30 хв етанол відбирали, осад підсушували і розчиняли в трис-ЕДТА-буфері.

Для позбавлення від залишків фенолу до розчину РНК додавали 1/10 об'єму 3 М Na-ацетату, 3 об'єми 96 %-го етанолу і залишали на ніч при -20 °С. Суміш центрифугували при 10000 g (10 хв). Осад розчиняли у воді, обробленій діетилпірокарбонатом. Для зберігання РНК у розчин додавали 1/10 об'єму 3 М Na-ацетату і 3 об'єми 96 %-го етанолу.

Концентрацію РНК визначали за оптичною густиною при $\lambda = 260$ нм, а чистоту препарату — за співвідношеннями A_{260}/A_{280} та A_{260}/A_{230} . Усі препарати РНК перевіряли на наявність домішок ДНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції без попередньої зворотної транскрипції.

Зворотна транскрипція РНК. Зворотну транскрипцію (ЗТ) здійснювали в об'ємі 50 мкл. До розчину, який містив 12,5 мкг РНК, додавали 2,5 мкл випадкових гексамерних праймерів («Phag-masia», Швеція) в концентрації 0,2 мкг/мкл і інкубували при 70 °С 5 хв для відпау праймерів. Потім додавали 5 мкл 10 мМ дезоксинуклеозидтрифосфатів («MBI Fermentas», Литва), 10 мкл п'ятикратного буфера (250 мМ трис-НСІ, рН 8,3, 250 мМ КСІ, 250 мМ MgCl₂, 50 мМ ДТТ) («MBI Fermentas»). Через 5 хв інкубації при 25 °С додавали 2,5 мкл M-MuLV зворотної транскриптази (200 од/мкл) («MBI Fermentas») і інкубували впродовж 60 хв за температури 42 °С. Реакцію зупиняли охолодженням на льодяній бані.

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). Реакційна суміш для ПЛР об'ємом 50 мкл в буфері (10 мМ трис-НСІ, рН 8,8, 50 мМ КСІ, 1,5 мМ MgCl₂) містила 15 мкл розчину кДНК для ампліфікації послідовностей ІФНа- або ІФНβ-специфічної кДНК чи 5 мкл розчину кДНК для ампліфікації S12-специфічної послідовності, а також чотири нуклеозидтрифосфати в концентрації 0,2 мМ кожний («MBI Fermentas»), 20 пмоль кожного з праймерів (ЗАО «Синтол», Росія) і 2,5 од. Тақ-полімерази. Щоб запобігти випаровуванню суміші, її покривали краплиною стерильного мінерального масла.

Реакція ампліфікації кожного з фрагментів кДНК складалася з попередньої денатурації (94 °С,

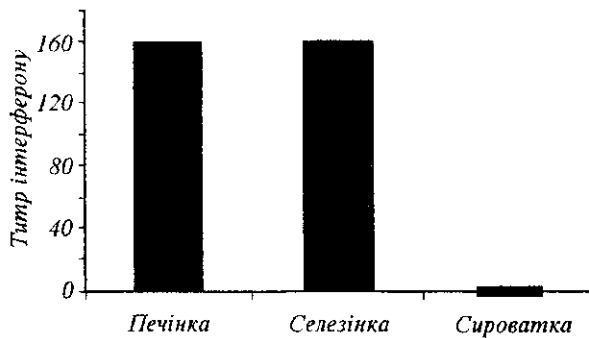


Рис. 1. Вміст інтерферону α/β в цитозолі печінки, селезінки та в сироватці крові інтактних щурів

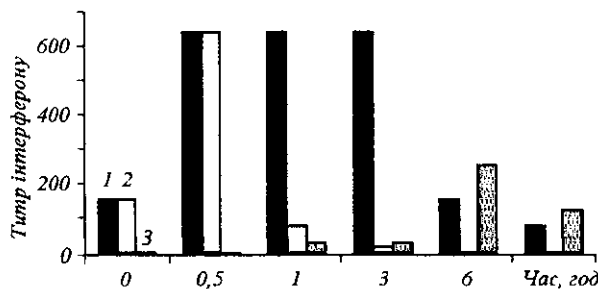


Рис. 2. Вміст інтерферону в цитозолі печінки, селезінки та в сироватці крові після ЧГЕ: 1 — печінка; 2 — селезінка; 3 — сироватка

4 хв), 30 циклів ампліфікації та завершальної полімеризації (72 °С, 7 хв). Температурні профілі повторюваних циклів для фрагментів трьох типів були різними. Для інтерферону альфа та S12-специфічних фрагментів він складався з денатурації за температури 94 °С (1 хв), відпалювання праймерів — 54 °С (1 хв), синтезу — 72 °С (30 с); для інтерферону бета — з денатурації — 94 °С (1 хв), відпалювання праймерів — 58 °С (1 хв), синтезу — 72 °С (30 с).

Гель-електрофорез продуктів ампліфікації проводили в 2 %-му агарозному гелі та 1·TBE буфері. При визначенні ампліфікованих ІФНа/β-специфічних продуктів їх осаджували етанолом з реакційної суміші ПЛР, розчиняли і наносили на гель. При визначенні ампліфікованого S12-специфічного продукту на гель наносили 20 мкл реакційної суміші ПЛР.

Дані електрофорезу візуалізували на приладі Ultrosan і фотографували цифровим фотоапаратом Canon PowerShot A75. Денситометрію електрофореграм проводили за допомогою програми GelPro.

Результати і обговорення. Визначення вмісту білка ІФНа/β в цитозолі печінки, селезінки та в сироватці крові. В інтактних тварин ІФНа/β виявляється в печінці та селезінці при однаковому титрі 1:160 і не виявляється у сироватці крові (рис. 1).

Після ЧГЕ протягом пререплікативного періоду вміст інтерферону α/β в печінці, селезінці та сироватці крові змінюється по-різному (рис. 2). Через 0,5 год після ЧГЕ титр інтерферону у печінці зростає в 4 рази (1:640). Він зберігається на одному рівні щонайменше упродовж 3 год і зменшується через 6—12 год.

У селезінці, так само як і в печінці, через 0,5 год після ЧГЕ зростає рівень інтеферону в 4 рази порівняно з інтактними тваринами. В цей самий час у сироватці крові ІФНа/β не визначається. Надалі ІФНа/β виявляється в сироватці крові за низького титру, який незначно підвищується через 6—12 год після ЧГЕ, коли титр його в печінці і селезінці зменшується. Це означає, що ЧГЕ стимулює в печінці і селезінці синтез ІФНа/β власними клітинами цих органів. Як відомо, внаслідок ЧГЕ маса печінки щонайменше в два рази більше за таку селезінки, тому зрозуміло, що саме в печінці утворюється значна кількість ІФНа/β, що зумовлено операцією.

Як зазначалося вище, у відновленні маси і функції печінки можна виділити декілька складових — тканинспецифічну реакцію печінки на ушкодження та компенсаторні реакції для підтримання життєво важливих функцій організму. Постає питання, чи не обумовлена зміна вмісту ІФНа/β після ЧГЕ реакцією на ушкодження і чи не характерна вона для реакції гострої фази? Для відповіді на це питання визначали вміст ІФНа/β після ЛАП у ті ж самі терміни, що й після ЧГЕ. Протягом 12 год після операції рівень ІФНа/β в цитозолі печінки, селезінки та в сироватці крові був нижчим за чутливість методу. Цей факт свідчить про те, що у відповідь на ушкодження синтез ІФНа/β в печінці і селезінці блокується, а його підвищене утворення після ЧГЕ пов'язане з відновлювальною складовою регенераційного процесу.

Для вивчення того, наскільки сильно ЧГЕ індукуює синтез ІФНа/β, провели визначення рівня ІФНа/β після введення специфічного індуктора його синтезу — полі(І)-полі(С). За цих умов продукція ІФНа/β в печінці втричі перевищує ту, яка спостерігається після ЧГЕ (рис. 3). В селезінці і

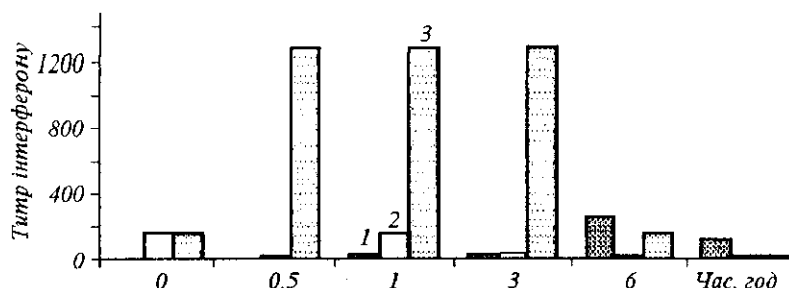


Рис. 3. Вміст інтерферону α/β у сироватці крові, цитозолі печінки та селезінки щурів після введення полі(І)-полі(С): 1 — сироватка; 2 — селезінка; 3 — печінка

сироватці крові вміст ІФНа α/β після стимулювання полі(І)-полі(С) ні за характером, ні за кількісними ознаками не відрізняється від того, який спостерігається після ЧГЕ.

Визначення відносного вмісту мРНК, яка кодує ІФНа α/β , в печінці щурів після ЧГЕ, ЛАП та введення полі(І)-полі(С). Для оцінювання відносного вмісту мРНК, яка кодує ІФНа α/β , у печінці інтактних тварин і тварин через 0,5; 1; 3; 6 та 12 год після ЧГЕ та ЛАП застосували метод ЗТ-ПЛР. Щоб підібрати праймери для ампліфікації фрагментів кДНК, які кодують інтерферони альфа і бета та рибосомний білок S12, було знайдено відповідні послідовності в базі даних NCBI. Послідовність за номером доступу X00336 відповідає гену ІФНа1 щурів і розшифрована авторами [9]. Ген ІФНа є одним із винятків серед генів еукариотів, бо не містить інтронів. Послідовність кДНК гена ІФН β щурів має номер доступу NM_019127 і розшифрована авторами роботи [10]. Послідовність кДНК, яка кодує рибосомний білок S12, секвенована Ліном із співавт. [11]. У базі NCBI вона має номер NM_031709.

Праймери та умови проведення ампліфікації фрагментів ІФНа α і β підібрано в програмі Vector NTI. Праймери були перевірені на здатність утворювати димери і шпильки. Специфічність праймерів визначали в програмі Blastn. Праймери до кДНК, яка кодує ІФНа1 щурів, обмежують ділянку в 208 п. н. (від 149 до 356 п. н.) послідовності ДНК.

Відомо, що в геномі щурів існує ще 11 послідовностей, гомологічних послідовності X00336. Комп'ютерний аналіз у програмі Vector NTI виявив, що підібрані праймери реасоціюють лише з ІФНа1-специфічною послідовністю і не взаємодіють з жодною з інших 11 ІФН-подібних послідовностей. Праймери також не взаємодіють з послідовністю кДНК, яка кодує ІФН β , гомологія якого з ІФНа складає 40,3 %. Праймери до кДНК, які кодують ІФН β , обмежують ділянку довжиною

487 п. н. (від 15 до 501 п. н.). Праймери до кДНК, яка кодує рибосомний білок S12, запозичено з роботи [11]. Вони обмежують ділянку довжиною 367 п. н. (від 90 до 457 п. н.).

Щоб напівкількісно оцінити, як змінюється рівень досліджуваних РНК і запобігти неминучим технічним похибкам, здійснено нормалізацію показників оптичної густини електрофоретичних смуг, які утворювали продукти ампліфікації, порівнюючи їх з відповідним показником ампліфікованого фрагмента кДНК, яка кодує рибосомний білок S12. Зазвичай для нормалізації даних використовують одну з РНК, що кодують білки «домашнього господарства». Рівень цієї РНК повинен бути стабільним. У такому разі кількість ампліфікованого продукту, який утворюється на базі цієї РНК, буде корелювати з кількістю нефракціонованої РНК, яку було взято для реакції ЗТ-ПЛР. Для кожного препарату нефракціонованої РНК інтегральну оптичну густину смуги цього продукту можна використати для нормалізації досліджуваних показників (рис. 4).

В інтактній печінці щурів детектується мРНК, яка кодує ІФНа, і її рівень прийнято за одиницю. Протягом відновлювального процесу цей рівень зменшується через 1 год після ЧГЕ, підвищується через 3 год і знову знижується о 6—12 год (рис. 5). Після ЛАП, починаючи з 0,5 год після операції і до 12-ї год, ІФНа-специфічну РНК виявити не вдається. Цей результат збігається з даними, отриманими на рівні білка, і свідчить про різке блокування експресії гена ІФНа протягом щонайменше 12 год після ушкодження.

Оскільки на рівні білка ми не диференціювали продукцію ІФНа і ІФН β , то це було зроблено за допомогою реакції ЗТ-ПЛР з використанням специфічних праймерів для ІФНа і ІФН β кДНК. Нами не виявлено продуктів ампліфікації фрагмента кДНК, яка кодує ІФН β , і, значить, відповідної РНК у препаратах як з інтактною печінкою, так і з печінкою після ЧГЕ і ЛАП.

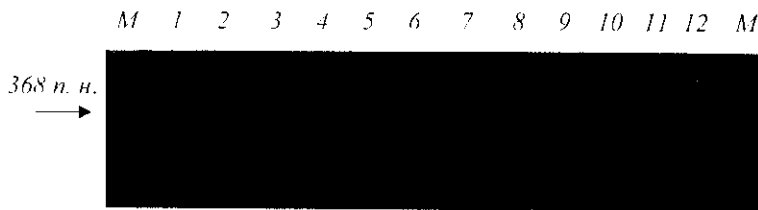


Рис. 4. Електрофореграма продуктів S12-специфічної реакції ЗТ-ПЛР з РНК інтактної і регенерувальної печінки. М — маркер. На доріжки нанесено продукти реакції ЗТ-ПЛР з РНК, виділеної з інтактної (1, 2) та регенерувальної печінки через 0,5 год (3, 4), 1 год (5, 6), 3 год (7, 8), 6 год (9, 10) та 12 год (11, 12) після ЧГЕ

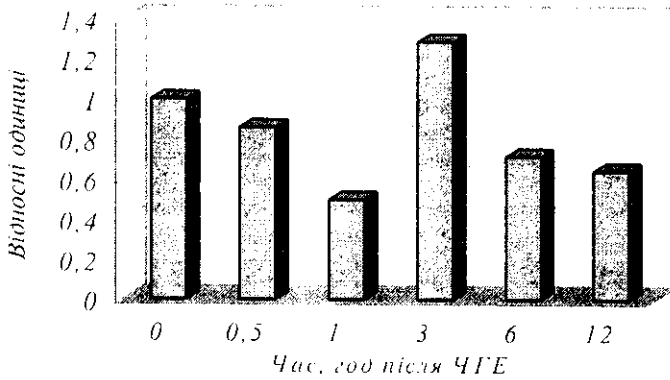


Рис. 5. Відносний вміст мРНК, яка кодує інтерферон α1, у печінці щурів після ЧГЕ

Таким чином, зафіксовані після ЧГЕ зміни на рівні білка і РНК стосуються винятково експресії гена ІФН α , а не ІФН β . Вони притаманні відновлювальному процесові і, вірогідно, кількісно менш виражені за рахунок іншої складової регенераційного процесу в печінці — реакції на ушкодження, яка супроводжується блокуванням експресії гена ІФН α . Суттєве зниження рівня білка ІФН α і ІФН α -специфічної РНК через 12 год після ЧГЕ не протирічить загальнопоширеним уявленням про антипроліферативну активність ІФН α [12]. Відомості про фактори, які певним чином негативно регулюють експресію ІФН α , лише починають з'являтися [13], але для конкретної моделі вони існують на рівні припущень [14].

Отримані результати мають поки що суто феноменологічний характер. Ми припускаємо, що характерна для відновлювального процесу експресія гена ІФН α потрібна для перепрограмування клітин, можливо, для часткової призупинки білкового синтезу та руйнування за допомогою РНК-ази L деяких РНК, які активно функціонували в період G0. Припинення експресії ІФН α в печінці після ЛАП свідчить про роль цього цитокіну як негативного регулятора реакції гострої фази.

Висновки. ІФН α синтезується в клітинах печінки інтактних щурів та щурів після ЧГЕ. Експресія ІФН альфа в печінці щурів після ЧГЕ є

характерною для відновлювальної складової регенераційного процесу з поки що нез'ясованою функцією. Експресія ІФН альфа в печінці щурів відсутня упродовж початкового етапу реакції гострої фази.

M. M. Perepelyuk, D. B. Fedorchenko, S. L. Rybalko, M. Yu. Obolenskaya

Interferon α expression in the rat liver after partial hepatectomy

Summary

The current work presents the investigation on IFN- α/β expression in rat liver after partial hepatectomy (PHE) and laparotomy (LAP). These operations were used to model the regeneration process and the acute phase response as a component of regeneration process. The relative content of IFN- α in total liver cytosol and IFN- α - and IFN- β -specific RNAs in total liver RNA were assessed by the biological test and by reverse transcription-polymerase chain reaction, respectively. IFN- α -specific RNA and IFN- α -protein were shown to be expressed in the intact and regenerating liver. IFN- β -specific RNA is not detected. IFN- α delivery to the liver via blood from other INF-producing cells is highly unlikely due to its negligible concentration in the blood serum. PHE induces the increase of IFN- α -specific RNA and protein content during G0/G1 transition of the liver from quiescence to proliferation (1–3 hours after PHE) with the further decrease in their content towards the G1/S transition of hepatocytes (12 hours after PHE). Quantitatively the up-regulation of IFN- α expression was less than maximally possible, which was observed after injection of typical inducer of IFN- α synthesis, poly(I)-poly(C). LAP completely blocked IFN- α expression which was manifested at RNA and protein level in 1, 3, 6, and 12 hours after the operation. Thus, the increase in IFN- α expression at the early phase of regeneration is essential for liver transition from quiescence to proliferation and IFN- α expression is incompatible with the acute phase response. A role of IFN- α in both processes is yet to be defined. The decrease in IFN- α expression till the G1/S transition of hepatocytes in 12 hours is consistent with a widely known concept about antiproliferative activity of IFN- α .

Keywords: IFN- α , liver regeneration.

M. M. Перепельюк, Д. Б. Федорченко, С. Л. Рыбалко, М. Ю. Оболенская

Експресія інтерферона і в печені крыс после частичной гепатэктомии

Резюме

Исследована експресія ІФН α/β в печені крыс после частичной гепатэктомии (ЧГЭ) и лапаротомии (ЛАП). Печень крыс после ЧГЭ и ЛАП использовали соответственно как модели регенерационного процесса и реакции острой фазы в ответ на повреждение, являющейся составляющей регенерационного

процесса. Содержание белка ИФНа определяли в суммарном цитозоле клеток печени в биологическом тесте, а относительное содержание ИФНа- и ИФНβ-специфических РНК в суммарном препарате РНК печени — с помощью обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции. Показано, что в печени интактных крыс и крыс после ЧГЭ экспрессируется ИФНа-специфическая РНК и белок ИФНа. ИФНβ-специфическая РНК не детектируется. Поступление ИФНа в печень с кровью считаем маловероятным, поскольку он или вообще не определяется в сыворотке крови или определяется в несравненно меньших концентрациях, чем в печени. ЧГЭ вызывает повышение уровня ИФНа-специфической РНК и белка на протяжении периода перехода неактивного в пролиферативном отношении органа к пролиферации (1–3 ч после ЧГЭ) и последующий спад к началу S-фазы первого клеточного цикла гепатоцитов (12 ч после ЧГЭ). В количественном отношении повышение экспрессии ИФНа в начале регенерационного процесса меньше максимально возможного, что выявлено в опытах с типичным стимулятором синтеза ИФНа, поли(1)-поли(С). ЛАП приводит к полной остановке экспрессии ИФНа, что показано через 1, 3, 6 и 12 ч после операции на уровне РНК и белка. Таким образом, повышенная экспрессия ИФНа на раннем этапе регенерационного процесса характерна для переходного периода. Экспрессия ИФНа несовместима с реакцией острой фазы. Значение ИФНа для обоих процессов остается неясным. Снижение синтеза ИФНа к 12-му ч после ЧГЭ согласуется с общеизвестными представлениями об антипролиферативной активности ИФНа.

Ключевые слова: ИФНа, регенерация печени.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Сидорова В. Ф. Постнатальный рост и восстановление внутренних органов у позвоночных.—М.: Наука, 1969.—190 с.
2. Лиознер Л. Д. Регенерация и развитие.—М.: Наука, 1982.—167 с.
3. Fausto N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells // *Hepatology*.—2004.—39.—P. 1477—1487.
4. Obolenskaya M. Yu. Cytokines and liver regeneration // *EOS—J. Immunol. and Immunopharmacol.*—1997.—17.—P. 51—58.
5. Оболенская М. Ю., Кэлье М., Сазонова Л. Я. 2', 5'-олиго(А)-синтезная активность на ранних этапах регенерационного процесса в печени крыс // *Биополимеры и клетка*.—1997.—13, № 5.—С. 391—396.
6. Obolenskaya M. Yu., Sazonova L., Rybalko S., Bisbal C. RNase L and genome expression during early period of liver regeneration at the rats // *Биополимеры и клетка*.—2000.—16, № 5.—P. 380—383.
7. Fey G. H., Gauldie J. The acute phase response of the liver in inflammation // *Progr. in liver diseases / Eds H. Popper, F. Schaffner*.—Philadelphia: W. B. Saunders Publ., 1990.—Vol. 89.—P. 89—116.
8. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // *Anal. Biochem.*—1987.—162.—P. 156—159.
9. Dijkema R., Pouwels P., de Reus A., Schellekens H. Structure and expression in *Escherichia coli* of a cloned rat interferon-alpha gene // *Nucl. Acids Res.*—1984.—12.—P. 1227—1242.
10. Yokoyama S., Ohishi N., Shamoto M., Watanabe Y., Yagi K. Isolation and expression of rat interferon beta gene and growth-inhibitory effect of its expression on rat glioma cells // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1997.—232.—P. 698—701.
11. Lin A., Chan Y. L., Jones R., Wool I. G. The primary structure of rat ribosomal protein S12. The relationship of rat S12 to other ribosomal proteins and a correlation of the amino acid sequences of rat and yeast ribosomal proteins // *J. Biol. Chem.*—1987.—262.—P. 14343—14351.
12. Stark G. R., Kerr I. M., Williams B. R., Silverman R. H., Schreiber R. D. How cells respond to interferons // *Annu. Rev. Biochem.*—1998.—67.—P. 227—264.
13. Honda K., Mizutani T., Taniguchi T. Negative regulation of IFN-alpha/beta signaling by IFN regulatory factor 2 for homeostatic development of dendritic cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—2004.—101.—P. 2416—2421.
14. Nishiguchi S., Otani S., Matsui-Yuasa I., Morisawa S., Monna T., Kuroki T., Kobayashi K., Yamamoto S. Inhibition by interferon (alpha + beta) of mouse liver regeneration and its reversal by putrescine // *FEBS Lett.*—1986.—205.—P. 61—65.

УДК 577.245

Надійшла до редакції 28.02.06