

13. Svab Z., Maliga P. *Nicotiana tabacum* mutants with chloroplast encoded streptomycin resistance and pirment deficiency // Theor. and Appl. Genet.—1985.—72, N 5.— P. 637—643.
14. New cloning vehicles for transformation of higher plants / G. An, B. D. Watson, S. Stachel et al. // EMBO J.—1985.—4, N 1.— P. 277—284.
15. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. Plant.—1962.—15, N 3.— P. 473—497.
16. *Intertribal* hybrid cell lines of *Atropa belladonna*+*Nicotiana chinensis* obtained by cloning individual protoplast fusion products / Y. Y. Gleba, V. P. Momot, N. N. Cherrep, M. V. Skarzhynskaya // Theor. and Appl. Genet.—1982.—62, N 1.— P. 75—79.
17. Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of *Nicotiana tabacum*+*Nicotiana knightiana* correlation of resistance to *N. tabacum* plastids / L. Menczel, F. Nagy, Z. R. Kiss, P. Maliga // Ibid.—1981.—59, N 2.— P. 191—195.
18. Kao K. N., Michayluk M. R. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media // Planta.—1975.—126, N 2.— P. 105—110.
19. Caboche M. Nutritional requirements of protoplast-derived haploid tobacco cell grown at low densities in liquid medium // Ibid.—1980.—149, N 1.— P. 7—18.
20. Transmission genetics of the somatic hybridization process in *Nicotiana*. II. Plastome heterozygotes / Y. Y. Gleba, I. K. Komarnitsky, N. N. Kolesnik et al. // Mol. and Gen. Genet.—1985.—198, N 4.— P. 476—481.
21. Archer F. K., Bonnett H. T. Characterization of a virescent chloroplast mutant of tobacco // Plant Physiol.—1987.—83, N 3.— P. 920—925.
22. Larkin P. J., Scowcroft W. R. Somaclonal variation — a novel source of variability from cell cultures for plant improvement // Theor. and Appl. Genet.—1981.—60, N 2.— P. 197—214.
23. Medgyesy P., Fejes E., Maliga P. Interspecific chloroplast recombination in a *Nicotiana* somatic hybrids // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1985.—82, N 7.— P. 6960—6964.

Отд-ние клеточ. биологии и инженерии  
Ин-та ботаники им. Н. Г. Холодного АН УССР, Киев

Получено 21.03.90

УДК 577.152.5

© Л. И. Кононенко, Т. А. Алексеева, Ю. Д. Иващенко,  
А. И. Быкорез, 1990

## ВЛИЯНИЕ СЫВОРОТКИ И ПЛАЗМЫ КРОВИ КРЫС С РЕГЕНЕРИРУЮЩЕЙ ПЕЧЕНЬЮ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ НОРМАЛЬНЫХ И ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ГЕПАТОЦИТОВ В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ

*Сыворотка крови интактных крыс незначительно модифицирует пролиферативную активность нормальных гепатоцитов в первичной культуре. В то же время сыворотка крови интактных и гепатэктомированных крыс в комплексе с эпидермальным фактором роста (ЭФР) и инсулином способна лишь ингибировать синтез ДНК клеток этой культуры.*

*У культивируемых трансформированных гепатоцитов по сравнению с нормальными уменьшается стимулирующий эффект ЭФР и инсулина. Сыворотка крови интактных крыс и крыс, подвергшихся частичной гепатэктомии, при добавлении в первичную культуру трансформированных гепатоцитов оказывает слабовыраженное действие: в одних — ингибирующее, в других — активирующее. Однако после комбинированного применения с ЭФР и инсулином наблюдается значительное снижение чувствительности к митогенному эффекту.*

*Плазма крови интактных и гепатэктомированных крыс сама по себе и в комбинации с ЭФР и инсулином лишь ингибирует синтез ДНК нормальных и трансформированных гепатоцитов в культуре.*

**Введение.** Установлено, что в регенерации печени принимает участие ряд митогенных полипептидов. К ним относятся эпидермальный фактор роста (ЭФР) и группа гепатотропных веществ, обнаруженных в ткани печени [1] и сыворотке крови [2—4]. Одним из таких веществ является трансформирующий фактор роста типа  $\beta$  (ТФР- $\beta$ ), выделенный из тромбоцитов [5]. Выяснилось, что в системе *in vitro* ТФР- $\beta$  бифункционален, и в зависимости от применяемой модели он может либо активировать, либо ингибировать пролиферацию. В первичной культуре гепа-

тоцитов реализуется ингибиторное действие этого полипептида, при этом наблюдается активация мембранных рецепторов ЭФР и синергизм в действии ТФР- $\beta$  и ЭФР [6]. ТФР- $\beta$  практически не выявляется в плазме крови, находясь в сыворотке в латентном состоянии [7] и будучи связанным с  $\alpha_2$ -макроглобулином [8].

Наши попытки выделить и охарактеризовать стимуляторы пролиферации гепатоцитов из сыворотки крови крыс после частичной гепатэктомии (ЧГЭ) окончились неудачей, так как мы не выявили веществ, сравнимых по митогенному действию с ЭФР и инсулином. Поэтому были предприняты эксперименты с использованием цельной сыворотки и плазмы крови крыс, подвергнутых ЧГЭ. При этом была поставлена задача выяснить, как они влияют на пролиферативную активность нормальных и трансформированных гепатоцитов в первичной культуре.

**Материалы и методы.** В опытах использовали белых беспородных крыс разводимой вивария Ин-та проблем онкологии им. Р. Е. Кавецкого АН УССР весом 150—200 г. Сыворотку и плазму крови брали через 5, 17 или 24 ч после ЧГЭ, которую проводили классическим способом, удаляя 2/3 печени под эфирным наркозом. В первичную культуру высаживали гепатоциты, полученные от нормальных животных и от крыс, которым в течение 3 месяцев ежедневно давали для питья 0,02 %-ный раствор N-диэтилнитрозамина (ДЭНА). При выделении трансформированных гепатоцитов использовали печень, пораженную опухолевым процессом, ткань которой была почти полностью замещена узлами гепатокарцином различной степени дифференцировки. Как нормальные, так и трансформированные гепатоциты выделяли перфузией печени раствором коллагеназы [9], затем их отделяли от детрита и непаренхиматозных клеток мягким центрифугированием.

После промывки в среде Игла клетки высаживали по  $10^5$  в 1 мл среды в 24-луночные пластиковые платы, предварительно покрытые крысиным коллагеном. Гепатоциты культивировали в среде Игла с антибиотиками, добавляя в первые 18—20 ч 20 % сыворотки крупного рогатого скота. Затем среду заменяли бессывороточной средой (БС) Игла и вносили в нее 25 % тестируемых образцов (ТО). Ими были: сыворотка и плазма крови нормальных крыс, а также сыворотка и плазма крови крыс, полученные в различные сроки после ЧГЭ. ТО применяли отдельно или в комплексе с ЭФР (30 нг/мл среды) и инсулином (200 нг/мл среды). ЭФР получали из слюнных желез самцов мышей [10].

ДНК-синтезирующую активность гепатоцитов оценивали, используя  $^3\text{H}$ -тимидин. Через 18—20 ч после роста гепатоцитов в среде Игла с 20 % бычьей сыворотки клетки отмывали БС, затем в нее добавляли 25 % ТО и митогены на 24 ч, после чего в культуральную среду вносили метку в концентрации 111 кБк/мл и выдерживали при 37 °С 24 ч. Гепатоциты разрушали кислотным гидролизом, снимали с лунок раббером и переносили на фильтры для просчитывания радиоактивности на  $\beta$ -счетчике. Для каждого варианта опыта использовали суммарно клетки не менее четырех лунок. Уровень синтеза ДНК в первичной культуре нормальных и трансформированных гепатоцитов после внесения ТО относили к таковому соответствующих гепатоцитов, находящихся в БС—ТО/БС. Если ТО вносили одновременно с ЭФР и инсулином, то полученные при этом данные, характеризующие репликацию ДНК, относили к таковым, полученным при использовании только БС—(ТО+ЭФР+инсулин)/БС или к БС с ЭФР и инсулином—(ТО+ЭФР+инсулин)/БС+ЭФР+инсулин).

**Результаты и обсуждение.** Вначале мы попытались, ответить на вопрос, насколько увеличивается уровень синтеза ДНК в нормальных и трансформированных гепатоцитах после добавления в БС митогенов ЭФР и инсулина? Оказалось, что в нормальных клетках он увеличился в 7,3 раза, а в трансформированных— в 4,8 раза ( $P < 0,05$ ), т. е. у последних чувствительность к действию указанных митогенов ниже (рис. 1, а, б).

При добавлении в БС сыворотки крови интактных крыс уровень синтеза ДНК в культивируемых нормальных гепатоцитах оказывается несколько выше, чем в гепатоцитах, культивируемых в БС, но более чем в 3 раза меньше, чем этот показатель при действии ЭФР и инсулина. Следовательно, сама по себе сыворотка интактных крыс обла-

дает слабой стимулирующей активностью или даже скорее модифицирует синтез ДНК. Добавление к сыворотке крови интактных крыс ЭФР и инсулина угнетает стимулированный этими факторами роста синтез ДНК нормальных гепатоцитов в культуре.

Синтез ДНК в нормальных гепатоцитах ингибируется также после добавления в БС сыворотки животных, подвергнутых ЧГЭ. При этом наибольшую ингибирующую активность имеет сыворотка крыс через

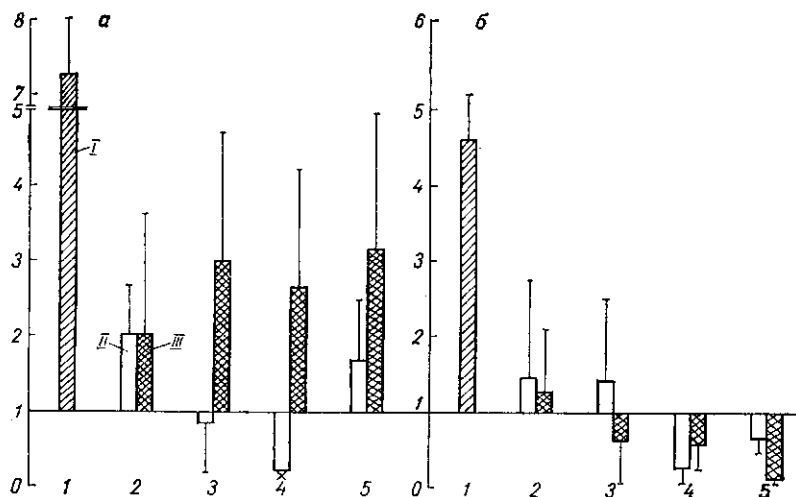


Рис. 1. Уровень синтеза ДНК нормальных (а) и трансформированных (б) гепатоцитов при применении одной сыворотки крови интактных или гепатэктомированных крыс (ТО), а также в комбинации с ЭФР и инсулином, отнесенный к таковому при культивировании гепатоцитов в БС (принят за 1): I — (ЭФР+инсулин)/БС; II — ТО/БС; III — (ТО+ЭФР+инсулин)/БС. Влияние ЭФР и инсулина на синтез ДНК в культивируемых гепатоцитах (1); влияние одной сыворотки крови нормальных крыс и в комбинации с ЭФР и инсулином на синтез ДНК в культивируемых гепатоцитах (2); влияние сыворотки крови крыс, полученной через 4 (3), 17 (4) и 24 ч (5) после ЧГЭ, а также в комбинации с ЭФР и инсулином на синтез ДНК в культивируемых гепатоцитах; х — один эксперимент

Fig. 1. The level of DNA synthesis in normal (a) and transformed (b) hepatocytes in the primary culture under the following culture conditions: TO — serum of normal or hepatectomized rats, TO+EGF+insulin — as above but with EGF and insulin added. All results are expressed in relation to the DNA/synthesizing level of hepatocytes cultivated in serum-free medium (БС) — accepted for 1.0: I — EGF-insulin/БС; II — ТО/БС; III — ТО+EGF+insulin/БС. The Influence of EGF and insulin on the DNA synthesis in the cultivated hepatocytes (1); influence of the serum alone or in combination with EGF and insulin on the DNA synthesis in cultivated hepatocytes (2); effect of serum obtained after 4 h (3), 17 h (4) or 24 h (5) after partial hepatectomy (serum alone or in combination with ERF and insulin); x — one experiment

17 ч после операции. Однако добавление одновременно с сывороткой крыс после ЧГЭ ЭФР и инсулина позволяет достичь некоторой стимуляции синтеза ДНК, хотя она в 2—3 раза меньше, чем стимуляция, наблюдаемая при действии одних митогенов. Кроме того, если в качестве контроля использовать уровень стимуляции, достигаемый при добавлении ЭФР и инсулина в БС, а не уровень синтеза ДНК в БС, то оказывается, что во всех случаях сыворотка как интактных, так и гепатэктомированных крыс обладает ингибирующим действием (рис. 2, а).

Таким образом, сыворотка интактных и особенно гепатэктомированных животных способна ингибировать синтез ДНК в первичной культуре нормальных гепатоцитов, активированных ЭФР и инсулином.

Сыворотка интактных крыс и крыс, подвергшихся ЧГЭ, при добавлении в первичную культуру трансформированных гепатоцитов оказывает слабо выраженное действие — в одних случаях стимулирующее, в других — ингибирующее (рис. 1, б). Поэтому усреднение данных иногда приводит к получению значений с ошибкой, превышающей само среднее значение. При этом после комбинированного применения ТО и митогенов у трансформированных гепатоцитов наблюдается снижение чув-

ствительности к митогенному эффекту ЭФР и инсулина, что отчетливо видно при сравнении данных на рис. 1, а, б, а также на рис. 2, б.

При добавлении к культивируемым нормальным и трансформированным гепатоцитам плазмы крови крыс после ЧГЭ также наблюдается ингибирование синтеза ДНК. Ингибиторная активность плазмы оказывается выше, чем сыворотки крови крыс. Она выражена в наибольшей степени после добавления к нормальным гепатоцитам плазмы крови,

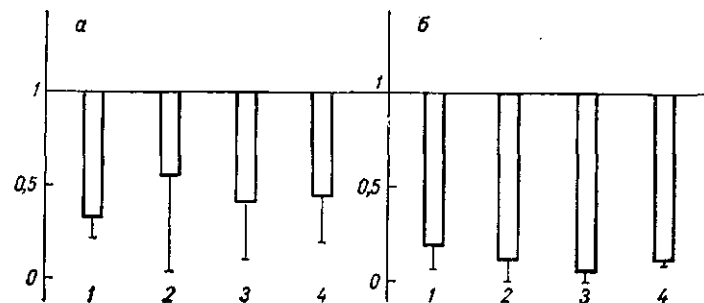


Рис. 2. Уровень синтеза ДНК нормальных (а) и трансформированных (б) гепатоцитов при применении сыворотки крови интактных и гепатэктомированных крыс в комбинации с ЭФР и инсулином, отнесенный к таковому после добавления в БС ЭФР и инсулина (принят за 1). Влияние сыворотки крови интактных (1) и гепатэктомированных крыс через 4 (2), 17 (3) и 24 ч (4) после ЧГЭ на синтез ДНК культивируемых гепатоцитов, стимулированных введением в среду ЭФР и инсулина

Fig. 2. The level of DNA synthesis in the normal (а) and transformed (б) hepatocytes in the primary culture under the influence of the same factors as in Fig. 1. All results are expressed in the relation to the DNA-synthesizing level of hepatocytes stimulated by EGF and insulin (accepted for 1.0). Serum from intact (1), or hepatectomized rats: 4 h (2), 17 h (3), 24 h (4) after the surgery

Рис. 3. Уровень синтеза ДНК нормальных (а) и трансформированных (б) гепатоцитов при применении одной плазмы крови крыс (1) и в комбинации с ЭФР и инсулином (2) через 4 ч после ЧГЭ, отнесенный к таковому в БС (принят за 1); х — один эксперимент

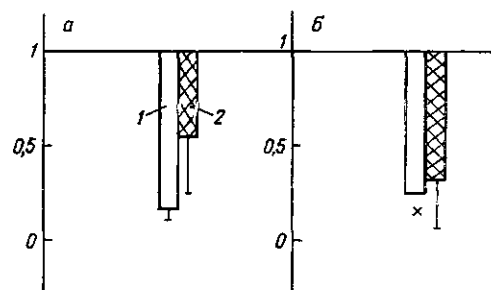


Fig. 3. The level of the DNA synthesis of normal (а) and transformed (б) hepatocytes under the influence of the rat blood plasma while applying plasma alone (1) or in combination with EGF and insulin (2) (plasma has been obtained 4 h after partial hepatectomy). All results are expressed in relation to the DNA-synthesizing activity of hepatocytes cultured in the serum-free medium (accepted for 1.0); х — one experiment

полученной у крыс через 17 ч после ЧГЭ. Чувствительность к подавлению синтеза ДНК не уменьшается после введения экзогенных митогенов. Для примера приведем данные влияния плазмы крови крыс, полученной через 4 ч после ЧГЭ, и экзогенных ЭФР и инсулина на уровень пролиферации культивируемых нормальных и трансформированных гепатоцитов (рис. 3, а, б).

Следовательно, наши данные указывают на присутствие в сыворотке и плазме крови интактных и гепатэктомированных крыс (в первые сутки после операции) ингибиторов пролиферации гепатоцитов. Природа их неясна. Возможно, они имеют отношение к тромбоцитарным ингибиторам пролиферации типа ТФР-β. Однако, так как плазма эффективнее ингибирует спонтанный и стимулированный факторами роста синтез ДНК, вероятно, эти факторы отличны от ТФР-β.

Следует отметить, что наши попытки выделить из сыворотки крови крыс с использованием различных способов фракционирования митогены типа ЭФР или инсулина были безуспешными. Выраженное подавление митогенной активности экзогенного ЭФР и инсулина сывороткой (плазмой) крови в культивируемых гепатоцитах может быть обуслов-

лено высокой концентрацией в крови  $\alpha_2$ -макроглобулинов и связыванием ими ЭФР. Это подтверждают наши данные [11] о том, что ЭФР способен образовывать ковалентные комплексы с белками сыворотки крови и тромбоцитов (с молекулярной массой около 180 000). У трансформированных гепатоцитов по сравнению с нормальными повышается чувствительность к ингибирующему действию сыворотки крови.

#### EFFECT OF BLOOD SERUM AND PLASMA IN RATS WITH REGENERATING LIVER ON PROLIFERATION OF NORMAL AND TRANSFORMED HEPATOCYTES IN THE PRIMARY CULTURE

*L. I. Kononenko, T. A. Alekseeva, Yu. D. Ivashchenko, A. I. Bykorez*

R. E. Kavetsky Institute of Oncology Problems,  
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

#### Summary

Blood serum of intact rats slightly modifies proliferative activity of normal hepatocytes in the primary culture. At the same time, the serum from intact and hepatectomized rats effectively inhibits the proliferation of hepatocytes stimulated by epidermal growth factor (EGF) and insulin. Transformed hepatocytes from the liver tumours are less sensitive to mitogenic effects of EGF and insulin. Serum from intact and hepatectomized rats inhibits EGF-stimulated DNA-synthesis in transformed hepatocytes, though serum alone slightly influences the hepatocytes proliferative rate. The same inhibitory activity has been found in the rat blood plasma.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *LaBrecque D.* *In vitro* stimulation of cell growth by hepatic stimulator substance // Amer. J. Physiol.— 1982.— 242, N 5.— P. 289—295.
2. *Morley C., Kingdon H.* The regulation of cell growth. 1. Identification and partial characterization of a DNA synthesis stimulation factor from the serum of partially hepatectomized rats // Biochem. et biophys. acta.— 1973.— 308, N 2.— P. 260—275.
3. *Nakamura T., Nawa K., Ichihara A.* Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats // Biochem. and Biophys. Res. Commun.— 1984.— 122, N 3.— P. 1450—1459.
4. Control of hepatocyte replication by two serum factors / G. Michalopoulos, K. Houck, M. Dolan, N. Luetke // Cancer Res.— 1984.— 44, N 10.— P. 4414—4419.
5. *Nakamura T., Teramoto H., Ichihara A.* Purification and characterization of a growth factor rat platelets from mature parenchymal hepatocytes in primary cultures // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1986.— 83, N 18.— P. 6489—6493.
6. *Shiota K., Nakamura T., Ichihara A.* Distinct effects of transforming growth factor- $\beta$  on EGF receptors and EGF-induced DNA synthesis in primary cultured rat hepatocytes // Biochem. Int.— 1986.— 13, N 5.— P. 893—901.
7. *Lawrence A.* Transforming growth factors — an overview // Cell. Biol.— 1985.— 53.— P. 93—98.
8. Purification and properties of epidermal growth inhibitor (EGF) from human platelets its separation from type transforming growth factor (TGF- $\beta$ ) / W. Huang, T. Kimura, K. Mashima et al. // J. Biochem.— 1986.— 100, N 2.— P. 687—696.
9. *Гринчишин В. П., Осипова Л. А., Винарчук М. П.* Получение изолированных гепатоцитов и их оценка // Цитология и генетика.— 1981.— 15, № 3.— С. 29—31.
10. Ускоренное получение высокоочищенного эпидермального фактора роста с помощью жидкостной хроматографии // Ю. Д. Иващенко, Л. А. Осипова, И. Т. Гут, Л. В. Гарманчук // Эксперим. онкология.— 1985.— 15, № 3.— С. 29—31.
11. Изучение белков, связывающий эпидермальный фактор роста в тромбоцитах и сыворотке крови крыс / Ю. Д. Иващенко, А. И. Быкорез, Л. В. Гарманчук и др. // Докл. АН СССР.— 1989.— № 3.— С. 67—71.

Ин-т проблем онкологии им. Р. Е. Кавецкого  
АН УССР, Киев

Получено 17.10.89