

**О. О. Фільченков**

## **Підвищення вмісту трансформуючого фактора росту типу $\alpha$ в епітелії тонкого кишечника щурів після резекції його більшої частини**

*В експериментах на крысах изучены особенности продукции трансформирующего фактора роста типа  $\alpha$  ( $\alpha$ -ТФР) клетками эпителиальной выстилки интактного тонкого кишечника и в ходе его компенсаторной регенерации. С этой целью животным выполняли резекцию 70 % тонкого кишечника или ложную операцию (ревизия брюшной полости). Содержание  $\alpha$ -ТФР определяли методами радиорецепторного анализа и иммуноблоттинга. Установлено, что через 3 сут после частичной энтерэктомии содержание продукции  $\alpha$ -ТФР возрастает более чем в 3 раза. Обсуждаются возможные механизмы участия  $\alpha$ -ТФР в адаптивных реакциях, происходящих в ходе регенерации тонкого кишечника.*

### **Вступ**

Епітелій тонкого кишечника людини є популяцією швидко проліферуючих клітин, що здатні до повного оновлення протягом 3 діб [4]. Особливе значення в регуляції проліферації, міграції та диференціювання стовбурових клітин епітеліальної вистілки кишкових крипт належить ростовим факторам, що продукуються локально або інтралюмінально. Епідермальний фактор росту (ЕФР) та ЕФР-подібні поліпептиди, біологічні ефекти яких опосередковані через загальний рецептор ЕФР, є найбільш вивченими регуляторами клітинних функцій [2].

ЕФР вперше було виділено Cohen як гідрофобну речовину, що стимулює проліферацію базальних кератиноцитів шкіри, прискорює відкриття очей і прорізування зубів у новонароджених гризунів [5]. Нині відомо, що головними джерелами ЕФР в організмі є підщелепні слинні залози, бруннерові залози дванадцятипалої кишки, молочні залози (у стані лактації) та нирки. Трансформуючий фактор росту типу  $\alpha$  ( $\alpha$ -ТФР), що також належить до родини ЕФР, уперше було виявлено у культуральному середовищі ретровірус-трансформованих клітин людини [17]. Коекспресію  $\alpha$ -ТФР і рецептора ЕФР нещодавно виявлено в ентероцитах нативних щурів [12]. Крім того, відзначено, що внутрішньовенне введення тваринам  $\alpha$ -ТФР стимулює проліферацію клітин епітелію травного тракту [14], тоді як за умов *in vitro* така дія фактора росту блокується після додавання  $\alpha$ -ТФР-специфічних антитіл [20]. Таким чином, можна зробити висновок щодо важливої ролі  $\alpha$ -ТФР у механізмах регуляції проліферації та оновлення клітин епітеліальної вистілки кишкових крипт *in vivo*. Разом з тим про участь  $\alpha$ -ТФР у регенерації кишкового епітелію майже нічого не відомо.

Метою нашої роботи було вивчення продукції  $\alpha$ -ТФР клітинами тонкого кишечника інтактних щурів та під час адаптаційно-компенсаторної перебудови, що відбувається у цьому органі після часткової ентеректомії.

### Методика

Експерименти проведено на 40 білих нелінійних щурах-самцях масою 175–200 г, розводки віварію Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України. Тварин поділили на дві групи (по 20 у кожній). Щурам I групи здійснювали ентеректомію 2/3 тонкого кишечника під ефірним наркозом. Для цього черевну порожнину розтинали середнім розрізом і кишечник, який витягували, резектували на 5 см дистальніше від зв'язки Трейтця і на 15 см проксимальніше ілеоцекального кута (рис. 1). Прхідність кишечника, що лишився, відновлювали за допомогою циркулярного шва. Тваринам II (контрольної) групи виконували тільки лапаротомію. Через 3 доби половину тварин обох груп декапітували під ефірним наркозом, а решту тварин — через 7 діб.

Тонкий кишечник декапітованих щурів промивали охолодженим ізотонічним розчином натрію хлориду та вивертали мукозним шаром назовні. Епітеліальний шар зіскрібали на льоду і проводили кислотнo-етанольну екстракцію білків [17]. Екстракти слизового шару тонкого кишечника збагачували гідрофобними білками за допомогою batch-методу (адсорбція білків у суспензії селікогелів  $C_8$  і  $C_{18}$  (фірма «Silasorb», Чехія)) [3]. Отримані таким чином зразки ліофілізували та зберігали при 4 °С.

Для оцінки вмісту ЕФР-подібних речовин у збагачених гідрофобними білками екстрактах використовували конкуруючий варіант радіорецепторного аналізу [8]. Для цього застосовували субконфлюентні культури клітин лінії HEp-2, які культивували у 96-лункових планшетах (фірма

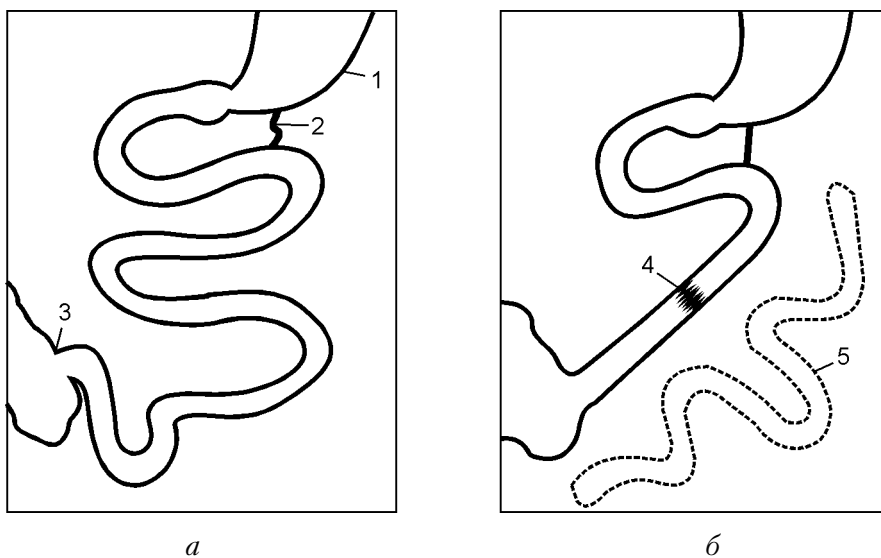


Рис. 1. Схема проведення хірургічних операцій: а — контроль (ревізія черевної порожнини); б — резекція 70 % тонкого кишечника: 1 — шлунок, 2 — зв'язка Трейтця, 3 — ілеоцекальний кут, 4 — шов кишки, 5 — видалена ділянка тонкого кишечника.

«Nunclon», Данія). До клітин додавали кратні розведення стандартного препарату ЕФР миші (0,05–256 нмоль/л) або аліквоти екстрактів, що тестувалися, та  $^{125}\text{I}$ -ЕФР (питома активність 1,25–1,65 кБк на 1 нг білка) у буфері 20 ммоль/л HEPES, рН 7,0, що містив 0,1% бичачого сироваткового альбуміну. У паралельні зразки не додавали стандартний препарат ЕФР. Після інкубації протягом 12 год при 4 °С середовище для культивування відбирали, а клітини тричі відмивали охолодженим середовищем DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, фірма «Gibco Europe», Велика Британія). Потім до клітин додавали 0,5 мл 1 моль/л розчину NaOH. Радіоактивність зразків розчинених клітин визначали на лічильнику Gamma Track 1191 (США).

Для ідентифікації імунореактивного  $\alpha$ -ТФР здійснювали електрофоретичне розділення білків екстрактів слизового шару, що тестувалися, з подальшим імуноблотингом (детальніше описано у роботі [8]). Паралельно оцінювали рівень конкурентного зв'язування  $^{125}\text{I}$ -ЕФР до і після обробки екстрактів слизового шару тонкого кишечника анти- $\alpha$ -ТФР антитілами у концентрації 10 мкг/мл протягом 2 год [13].

Статистичну обробку результатів проводили з використанням критерію *t* Стьюдента.

## Результати

При порівнянні вмісту ЕФР-конкурентної активності в екстрактах слизового шару тонкого кишечника встановлено, що його максимальне значення виявлено на 3-тю добу після операції у ділянці тонкого кишечника, що залишилася після резекції його більшої частини (таблиця). При цьому з'ясувалося, що рівень ЕФР-конкурентної активності на 3-тю добу після резекції тонкого кишечника у середньому втричі перевищує такий у тонкому кишечнику тварин, яким здійснювали тільки лапаротомію. Через 7 діб після проведення операцій рівень ЕФР-конкурентної активності також був

**Активність, конкурентна з епідермальним фактором росту (ЕФР), у зразках інтактного тонкого кишечника щурів і його дистальної ділянки після резекції 70 % тонкого кишечника ( $M \pm m$ )**

Хірургічне втручання	Тестування екстрактів	
	без обробки антитілами проти $\alpha$ -ТФР	після обробки антитілами проти $\alpha$ -ТФР
Через 3 доби		
Лапаротомія (контроль)	1,6 $\pm$ 0,4	0,8 $\pm$ 0,3
Резекція 70 % тонкого кишечника	5,0 $\pm$ 0,5*	2,3 $\pm$ 0,5
Через 7 діб		
Лапаротомія (контроль)	1,5 $\pm$ 0,3	0,8 $\pm$ 0,4
Резекція 70 % тонкого кишечника	1,9 $\pm$ 0,3	1,1 $\pm$ 0,4

Примітка. Результати наведено у номолях-еквівалентах ЕФР миші;

\*  $P < 0,05$  порівняно з контролем.

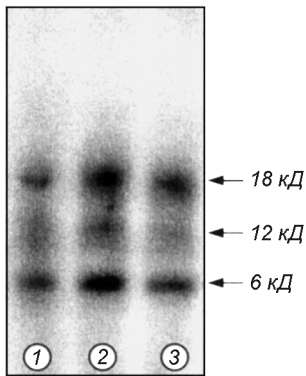


Рис. 2. Виявлення імуореактивних форм  $\alpha$ -ТФР за допомогою імуоблотингу: 1 — тонкий кишечник тварин, яким виконували лапаротомію (контроль); 2 і 3 — дистальна ділянка тонкого кишечника через 3 і 7 днів після проксимальної резекції 70 % тонкого кишечника відповідно.

вищим у тварин з видаленою частиною кишечника, проте ці відмінності були статистично невірогідними.

За результатами імуоблотингу в усіх екстрактах слизового шару тонкого кишечника наявний імуореактивний  $\alpha$ -ТФР (рис. 2). При електрофоретичному розділенні білків екстрактів, збагачених гідрофобними субстанціями, виявляється не тільки зріла форма  $\alpha$ -ТФР з молекулярною масою близько 6 кДа, але й більш високомолекулярні форми попередника цього поліпептиду (12 і 18 кДа).

Для того щоб перевірити, чи пов'язано підвищення рівня ЕФР-конкурентної активності в екстрактах тонкого кишечника під час його регенерації зі змінами експресії білка  $\alpha$ -ТФР, ми виконали радіорецепторний аналіз цих екстрактів до та після їх взаємодії з антитілами, які специфічно зв'язують  $\alpha$ -ТФР. Виявилось, що після обробки екстрактів слизового шару такими антитілами рівень їх ЕФР-конкурентної активності знижується лише на 55 % (див. таблицю).

## Обговорення

Хірургічне видалення частини кишечника є одним з найбільш поширених методів моделювання регенераційних процесів у цьому органі. Резекція 2/3 кишкової трубки спричинює розвиток значно виражених адаптаційно-компенсаторних змін у ділянці тонкого кишечника, що залишилася. Головною відмінністю цих змін слід вважати процеси гіпертрофії/гіперплазії. При цьому відзначається збільшення розмірів ворсинок і крипт, скорочення тривалості життєвого циклу «середнього» ентероцита, розширення криптальних зон проліферації та зниження ступеня диференціювання елементів слизового шару [1]. У даному дослідженні, використовуючи модель резекції 70 % тонкого кишечника щурів, ми відзначили, що на 3-тю добу після ентеректомії компенсаторна регенерація ділянки, що залишилася, супроводжується трикратним підвищенням рівня ЕФР-подібних факторів росту в слизовій оболонці. На 7-му добу після резекції їх рівень також дещо відрізнявся від такого в тканині кишечника тварин, яким виконували лише лапаротомію (див. таблицю). Подібне підвищення експресії  $\alpha$ -ТФР відзначали й інші автори, які вивчали регенераційні процеси в тонкому кишечнику після впливу цитотоксичних агентів [6] або опромінення [18]. У першому випадку у відповідь на масову загибель проліферуючих клітин

тонкокишкових крипт виявлено значну активацію формування нових крипт, збільшення індексу ДНК-синтезуючих клітин і скорочення тривалості їх мітотичного циклу, які супроводжуються компенсаторними змінами в експресії  $\alpha$ -ТФР. У випадку адаптаційної реакції після впливу рентгенівського опромінювання вміст мРНК  $\alpha$ -ТФР у криптах підвищується через 2 доби, практично повертаючись до початкового рівня на 8-му добу [18].

Метод радіорецепторного аналізу не дає можливості диференціювати ЕФР-подібні поліпептиди, ЕФР і  $\alpha$ -ТФР, які виявлялися в екстрактах слизового шару тонкого кишечника, оскільки ці фактори зв'язуються із загальним рецептором. Тому ми проводили імуноблотинг, застосовуючи антитіла, які специфічно розпізнають  $\alpha$ -ТФР. Відзначається, що в усіх екстрактах кишечника оперованих (резекція тонкого кишечника або лапаротомія) тварин виявляється імунореактивний білок  $\alpha$ -ТФР з молекулярною масою 6, 12 та 18 кДа відповідно (див. рис. 2). При цьому у екстрактах слизового шару тонкого кишечника через 3 доби після резекції його більшої частини відзначається підвищення рівня усіх форм  $\alpha$ -ТФР. Виявлені високомолекулярні форми  $\alpha$ -ТФР, імовірно, є попередником  $\alpha$ -ТФР у різних стадіях його протеолітичного розщеплення та глікозилювання або олігомерною формою цього фактора росту. Подібні форми  $\alpha$ -ТФР виявлено у культуральному середовищі клітин, трансфікованих геном  $\alpha$ -ТФР щурів, а також у слині [7, 19].

Результати досліджень з оброблення екстрактів регенеруючого кишечника антитілами, які розпізнають  $\alpha$ -ТФР, довели, що ЕФР-конкурентний матеріал в екстрактах, що тестувалися, представлений не тільки  $\alpha$ -ТФР. Імовірно, у слизовій оболонці тонкого кишечника є ЕФР, який продукується бруннеровими залозами дванадцятипалої кишки, та інші подібні поліпептиди. Але слід підкреслити, що участь ЕФР та  $\alpha$ -ТФР у регуляторних процесах на початкових етапах адаптаційної регенерації тонкого кишечника, мабуть, відрізняється. Основна біологічна дія ЕФР у кишечнику пов'язана із загоюванням пошкоджень епітеліального шару, а не зі стимуляцією проліферації ентероцитів у нормі (як у випадку  $\alpha$ -ТФР) [15].

Накопичені до цього часу експериментальні дані дають підставу припустити наявність декількох механізмів участі  $\alpha$ -ТФР у регуляції процесів гіпертрофії/гіперплазії клітин, які відбуваються під час регенерації тонкого кишечника. По-перше, цей біорегулятор може справляти пряму мітогенну дію на ентероцити ділянки кишечника, що залишилася після ентероектомії. Процеси регенерації у криптах починаються саме з посилення проліферації на всіх рівнях крипт, причому зона проліферації звичайно розширюється до самого крипто-ворсинчатого сполучення [16]. Дисбаланс між збільшенням розмірів клітин епітеліальної вистілки кишечника і швидкістю міграції стовбурових клітин уздовж ворсинок призводить до скорочення життєвого циклу ентероцитів [11]. Внаслідок скорочення часу міграції стовбурових клітин може виникати популяція функціонально незрілих клітин. У свою чергу, поява популяції швидко проліферуючих клітин з низьким ступенем диференціювання є джерелом збільшення продукції автокринних факторів росту, у тому числі  $\alpha$ -ТФР. По-друге, мітогенна дія  $\alpha$ -ТФР у регенеруючому кишечнику може бути опосередкованою, наприклад, за допомогою

стимуляції  $\alpha$ -ТФР продукції гормонів кишечника [10]. По-третє, участь  $\alpha$ -ТФР в адаптаційній регенерації тонкого кишечника може бути пов'язана з його здатністю стимулювати міграцію ентероцитів, котра, як відомо, не залежить від проліферативної активності останніх [9]. Зазначено, що  $\alpha$ -ТФР справляє виражений мітогенний ефект на ентероцити [21]. Таким чином, підвищення вмісту  $\alpha$ -ТФР на початкових етапах адаптаційної регенерації забезпечує не лише максимальну проліферацію ентероцитів, але й активну їх міграцію із дна крипт на ворсинку.

**A. A. Philchenkov**

### **ELEVATED LEVEL OF TGF-ALPHA IN RAT SMALL INTESTINAL MUCOSA FOLLOWING MASSIVE SMALL BOWEL RESECTION**

This study was performed to determine the changes in TGF-alpha production during compensatory regeneration of small intestine. For this purpose rats underwent either 70% small bowel resection or sham operation. Levels of TGF-alpha production were evaluated by radioreceptor assay and Western blotting. When compared with sham operation, small bowel resection resulted in threefold increase in the production of TGF-alpha at postoperative day 3. Possible mechanisms of TGF-alpha involvement in intestinal adaptation following massive small bowel resection are discussed.

*R. E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology  
National Academy of Science of Ukraine, Kiev*

### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Груздков А.А., Гусев В.М., Егорова В.В. и др. Адаптационно-компенсаторные процессы: на примере мембранного гидролиза и транспорта. — Л.: Наука, 1991. — 288 с.
2. Фильченко А.А. Цитокины суперсемейства ЭФР и онкогенез // Эксперим. онкология. — 1998. — **20**, № 2. — С. 83-108.
3. Фильченко А.А., Иващенко Ю.Д., Кулик Г.А. Получение эпидермального фактора роста с помощью гидрофобной хроматографии // Там же. — 1991. — **13**, № 5. — С.71-74.
4. Человек: Медико-биологические данные (Публикация N 23 Международной комиссии по радиологической защите). — М: Медицина, 1977. — 496 с.
5. Cohen S. Epidermal growth factor (Lecture for the Nobel Foundation 1987, Stockholm) // In Vitro Cell. Dev. Biol. — 1987. — **23**, N 4. — P. 239-246.
6. Dignass A.U., Stow J.L., Babyatsky M.W. Acute epithelial injury in the rat small intestine *in vivo* is associated with expanded expression of transforming growth factor alpha and beta // Gut. — 1996. — **38**, N 5. — P. 687-693.
7. Humphreys-Beher M.G., Macauley S.P., Chegini N. et al. Characterization of the synthesis and secretion of transforming growth factor-alpha from salivary glands and saliva // Endocrinology. — 1994. — **134**, N 2. — P. 963-970.
8. Ivashchenko Yu.D., Gout I.T., Philchenkov A.A. et al. The possible involvement of transforming growth factor  $\alpha$ , but not epidermal growth factor, in rat liver carcinogenesis induced by N-diethylnitrosamine // Exp. Oncol. — 1992. — **14**, N 5. — P. 31-34.
9. Kaur P., Potten C.S. Cell migration velocities in the crypts of the small intestine after cytotoxic insult are not dependent on mitotic activity // Cell Tissue Kinet. — 1986. — **19**, N 6. — P. 601-610.
10. Lee H.M., Udipi V., Englander E.W. et al. Stimulatory actions of insulin-like growth factor-I and transforming growth factor-alpha on intestinal neurotensin and peptide YY // Endocrinology. — 1999. — **140**, N 9. — P. 4065-4069.

11. Menge H., Hopert R., Alexopoulos T., Riecken E.O. Three-dimensional structure and cell kinetics at different sites of rat intestinal remnants during the early adaptive response to resection // Res. Exp. Med. — 1982. — **181**, N 2. — P. 77-94.
12. Montaner B., Asbert M., Perez-Tomas R. Immunolocalization of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in the rat gastroduodenal area // Dig. Dis. Sci. — 1999. — **44**, N 7. — P. 1408-1416.
13. Philchenkov A.A., Kudryavets Yu.I. Detection of TGFalpha-like substances in medium conditioned by human histiocytic lymphoma cells (U937) // Exp. Oncol. — 1995. — **17**, N 3. — P. 183-186.
14. Playford R.J., Boulton R., Ghatei M.A. et al. Comparison of the effects of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor on gastrointestinal proliferation and hormone release // Digestion. — 1996. — **57**, N 5. — P. 362-367.
15. Playford R.J., Wright N.A. Why is epidermal growth factor present in the gut lumen? // Gut. — 1996. — **38**, N 3. — P. 303-305.
16. Potten C.S. Regeneration in epithelial proliferative units as exemplified by small intestinal crypts // Ciba Found. Symp. — 1991. — **160**. — P. 54-71.
17. Roberts A.B., Lamb L.C., Newton D.L. et al. Transforming growth factors: isolation of polypeptides from virally and chemically transformed cells by acid/ethanol extraction // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1980. — **77**, N 21. — P. 3494-3498.
18. Rulfrok A.C., Weil M.M., Mason K.A., Thames H.D. Induction of transforming growth factor alpha in irradiated mouse jejunum // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. — 1998. — **42**, N 5. — P. 1137-1146.
19. Teixido J., Wong S.T., Lee D.C., Massague J. Generation of transforming growth factor-alpha from the cell surface by an O-glycosylation-independent multistep process // J. Biol. Chem. — 1990. — **265**, N 11. — P. 6410-6415.
20. Wagner C.L., Forsythe D.W., Wagner M.T. The effect of recombinant TGFalpha, human milk, and human milk macrophage media on gut epithelial proliferation is decreased in the presence of a neutralizing TGFalpha antibody // Biol. Neonate. — 1998. — **74**, N 5. — P. 363-371.
21. Wilson A.J., Gibson P.R. Role of epidermal growth factor receptor in basal and stimulated colonic epithelial cell migration *in vitro* // Exp. Cell. Res. — 1999. — **250**, N 1. — P.187-196.

*Ин-т експерим. патології, онкології  
і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького  
НАН України, Київ*

*Матеріал надійшов  
до редакції 28.02.2000*