

## Влияние аллогенной трансплантации криоконсервированных гепатоцитов и клеток плодовой печени на течение экспериментальной гиперхолестеринемии кроликов

А.С. ЛЕБЕДИНСКИЙ, Н.А. ВОЛКОВА, Д.В. ЧЕРКАШИНА, А.Ю. ПЕТРЕНКО  
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Показано, что изолированные зрелые гепатоциты при трансплантации способны длительно выживать, выполнять гепатоспецифические функции и даже делиться в организме реципиента при условии использования адекватной иммуносупрессии [1, 2]. Ввиду низкой иммуногенности, богатства ростовыми факторами и высочайшего пролиферативного потенциала, внимание исследователей в последние годы привлекают предшественники паренхиматозных клеток печени [3, 4]. Центральная роль, которую печень играет в обмене липидов и развитии его расстройств [5], может рассматриваться как достаточное основание для экспериментального изучения возможности коррекции этого спектра заболеваний путем трансплантации клеток печени, как зрелых, так и плодового происхождения.

Наиболее распространенными и опасными, с учетом их связи с риском развития атеросклероза, являются патологические состояния, связанные с повышением содержания холестерина (ХС) в крови. Характерным признаком развития патологии является нарушение антиоксидантно-прооксидантного равновесия в печени и повышение содержания продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в крови [5, 6]. Исследования *in vivo* действия криоконсервированных гепатоцитов и клеток плодовой печени при аллотрансплантации при дислипидемических состояниях может явиться основой для разработки новых подходов к коррекции гиперхолестеринемии.

В связи с вышеизложенным, целью работы явилось сравнение характера действия криоконсервированных гепатоцитов и клеток плодовой печени на обмен и перекисное окисление липидов при аллотрансплантации кроликам с экспериментальной гиперхолестеринемией.

### Материалы и методы

Изолированные гепатоциты и клетки плодовой печени получали неферментативным методом как описано [7]. Криоконсервирование клеток осуществляли по трехэтапной программе замораживания под защитой 5% ДМСО [8]. Криокон-

сервированные клетки хранили в условиях низкотемпературного банка в течение 2-3 мес. после чего использовали для трансплантации. Жизнеспособность клеток оценивали в тесте с трипановым синим.

Для формирования модели экспериментальной гиперхолестеринемии кроликам самцам в возрасте 6 мес. ежедневно в течение 5 мес. скармливали по 0,5 г ХС. После этого животных разбили на 3 группы (n=5). Животным первой группы под внутривенным наркозом тиопенталом натрия (50 мг/кг) в портальную вену вводили по  $10^8$  криоконсервированных гепатоцитов, суспендированных в 20 мл физиологического раствора, со скоростью 1 мл/мин. Второй группе при аналогичных условиях трансплантировали клетки плодовой печени. Животным третьей группы, контрольной, аналогично вводили по 20 мл физиологического раствора. В день операции, а также на 1, 2, 3, 5, 7 сутки и далее на 14, 21 и 28 сутки производили взятие проб крови из ушной вены для биохимических исследований. На 28 сутки животных забивали и брали образцы печени для биохимических и гистологических исследований. В течение всего послеоперационного периода животные продолжали получать с пищей холестерин.

В сыворотке крови определяли содержание ОХС, ХС ЛПВП и ТАГ ферментативными методами с использованием готовых наборов. Коэффициент атерогенности (КА) вычисляли, как предложено в работе [9], по формуле:  $КА = (ОХС - ХС ЛПВП) / ХС ЛПВП$ .

Активность каталазы определяли в гомогенатах печени спектрофотометрически по убыли перекиси водорода при 240 нм [10]. Активность глутатионредуктазы определяли спектрофотометрически по убыли НАДФ в присутствии окисленного глутатиона при 340 нм [11]. Содержание восстановленного глутатиона определялось по образованию комплекса с аллоксаном [12]. Интенсивность индуцированного ПОЛ в гомогенате печени определяли по скорости накопления ТБК-активных продуктов за 10 мин инкубации (37°C) в среде, содержащей 50 мМ трис-НСl, 50 мМ NaCl, 0,25 мМ аскорбата и 12 мкмоль FeSO<sub>4</sub>. Скорость накопления ТБК-активных продуктов определяли спектрофотометрически по интенсивности поглощения комплекса ТБК с продуктами

Адрес для корреспонденции: Лебединский А.С., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-41-35, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

ПОЛ при 535 и 580 нм, выражали в пмоль МДА/мг белка за 1 мин [13].

Для гистологических исследований ткань печени фиксировали в 10 %-ом формалине, после чего препараты промывали, обезвоживали в батарее спиртов восходящей концентрации, просветляли в ксилоле и заливали в парафин. Срезы ткани толщиной 5-7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Часть материала использовали для изготовления криостатных срезов толщиной 10 мкм (температура камеры криостата  $-20^{\circ}\text{C}$ ), которые затем окрашивали раствором судана черного для выявления общих липидов и раствором судан III + судан IV для выявления нейтральных жиров [14].

Результаты представлены как ср. значение  $\pm$  ср. кв. отклонение. Для статистического сравнения результатов использовали непараметрический метод статистического анализа Манна-Уитни.

### Результаты

Развитие модели экспериментальной гиперхолестеринемии отслеживали по изменению содержания ОХС в сыворотке крови, которое у интактных животных составило  $0,31 \pm 0,17$  ммоль/л. Через месяц скармливания холестерина данный параметр возрастал до  $1,98 \pm 0,85$  ммоль/л и в дальнейшем оставался неизменным. Через 5 месяцев холестериневой диеты кроликам первой группы трансплантировали криоконсервированные аллогенные зрелые гепатоциты, второй – криоконсервированные клетки плодовой печени кроликов, а третьей – контрольной – вводили физиологический раствор.

Свежевыделенные гепатоциты имели жизнеспособность 79-86%. Их криоконсервирование по трехэтапной программой замораживания под защитой 5% ДМСО приводило к снижению жизнеспособности на 20-25%. Жизнеспособность свежевыделенных клеток плодовой печени составляла 88-96%. Их криоконсервация аналогичным методом приводила к снижению жизнеспособности на 10-15%, что свидетельствует о большей устойчивости клеток плодового происхождения к действию низких температур по сравнению со зрелыми гепатоцитами.

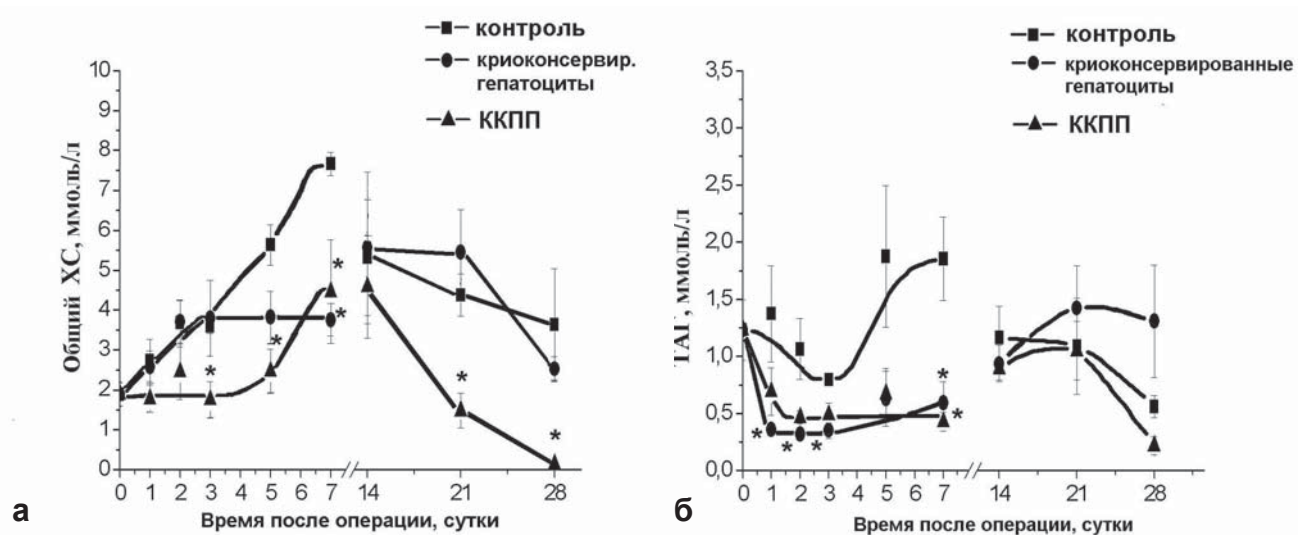
Как видно из рис.1, в группе контрольных животных в ответ на оперативное вмешательство на протяжении первой недели происходило значительное возрастание в сыворотке крови концентрации ОХС с максимумом на 7-е сутки (4-кратное возрастание показателя). Затем концентрация ХС постепенно снижалась и на 28 сутки возвращалась к дооперационному уровню, значительно превышающему уровень интактных животных. Трансплантация зрелых гепатоцитов

тормозила возрастание концентрации ОХС в сыворотке крови в период с 5 по 7-е сутки. После трансплантации плодовых клеток значительный гипохолестеринемический эффект отмечался в два промежутка времени – на первой неделе (3-7 послеоперационные сутки) и в отдаленные сроки наблюдения (между 21 и 28-и сутками). При этом на 28-е сутки у животных, которым были трансплантированы ККПП, содержание ОХС в сыворотке крови было в 25 раз ниже, чем в контрольной группе, и в 13 раз ниже дооперационного, достигая уровня нормы.

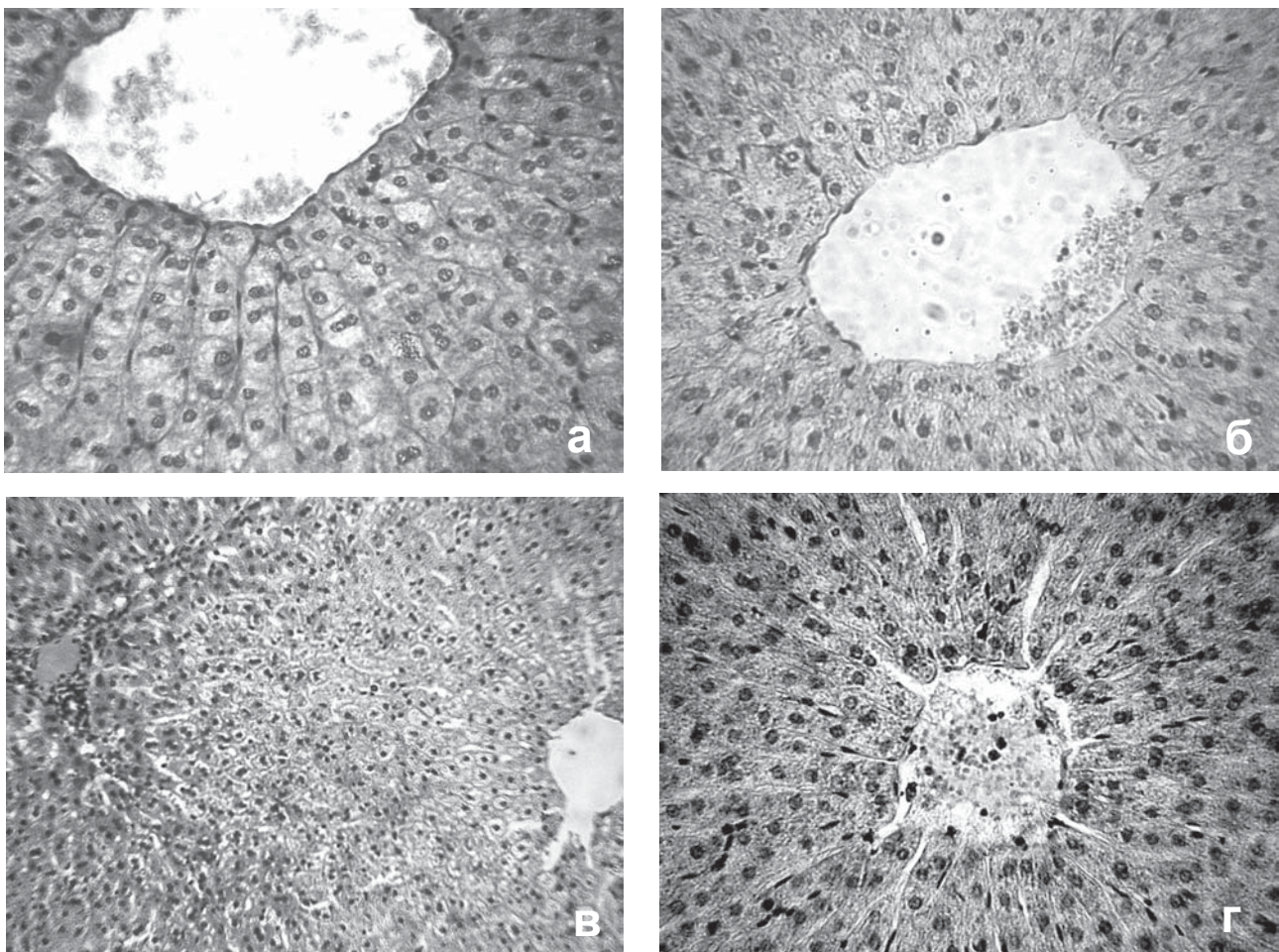
Содержание ХС ЛПВП в сыворотке крови животных контрольной группы возрастало на протяжении 5-28-х суток после операции. После аллотрансплантации криоконсервированных гепатоцитов достоверных отличий по сравнению с контролем не было выявлено на протяжении всего периода наблюдения. У группы животных, которым трансплантировали клетки плодовой печени, уровень ХС ЛПВП на 14-28 сутки после операции был достоверно ниже контрольного ( $p < 0,05$ ), на 28-е сутки достигая уровня интактных животных. Поскольку в эти же сроки снижалось также и содержание ОХС в этой группе, то для оценки перераспределения между атерогенными (ЛП низкой плотности и очень низкой плотности) и антиатерогенными (ЛПВП) фракциями был подсчитан коэффициент атерогенности. Оказалось, что на 21 и 28-е сутки он был ниже контрольного соответственно в 1,6 и 2,8 раза. То есть после трансплантации криоконсервированных клеток плодовой печени наблюдалось не только значительное снижение концентрации ОХС в сыворотке крови, но и его перераспределение в пользу антиатерогенных липопротеинов.

Концентрация ТАГ в сыворотке крови животных контрольной группы достоверно не отличалась от дооперационного уровня на протяжении всего периода наблюдения (рис. 1) и незначительно превышала уровень нормы ( $0,77 \pm 0,12$  ммоль/л). После трансплантации криоконсервированных гепатоцитов данный параметр был достоверно ниже на 1, 2, 3 и 7-е сутки, то есть практически на протяжении всей первой недели. Достоверное снижение содержания ТАГ в сыворотке крови после введения ККПП наблюдалось только на 7-е сутки. В отдаленные сроки наблюдения в обеих экспериментальных группах достоверных отличий от значений показателя в контрольной группе не наблюдалось.

Изучение морфологического состояния печени кроликов контрольной группы (рис. 2) выявило, что проведение хирургической операции и введение физиологического раствора на фоне сформированной гиперхолестеринемии и ведение после-



**Рис. 1.** Концентрация ОХС (А) и ТАГ (Б) в сыворотке крови кроликов с экспериментальной гиперхолестеринемией после аллотрансплантации криоконсервированных гепатоцитов и клеток плодовой печени. \* – различия достоверны по сравнению с контролем,  $p < 0,05$ .



**Рис. 2.** Гистологическое состояние печени кроликов с экспериментальной гиперхолестеринемией через 28 суток после аллогенной трансплантации криоконсервированных гепатоцитов и ККПП: а – норма ( $\times 250$ ), б – контроль ( $\times 250$ ), в – трансплантация криоконсервированных гепатоцитов ( $\times 100$ ), г – трансплантация ККПП ( $\times 250$ ). Окраска гематоксилином и эозином.

операционного периода при дальнейшем алиментарном поступлении экзогенного ХС приводит к формированию синдрома регенераторно-пластической недостаточности печеночной паренхимы. Негативные структурные изменения, происходящие в печени животных контрольной группы, могут быть частично компенсированы, если выполнена аллогенная трансплантация криоконсервированных гепатоцитов даже на фоне продолжения алиментарной гиперхолестеринемии: гистологически выявляются четкие перипортальные зоны восстановления печеночного эпителия с нормальными морфологическими признаками (рис. 2). Окрашивание на общие липиды с помощью судана черного продемонстрировало однозначное нарастание суданофильности гепатоцитов в трабекулах по направлению от портальной зоны к центральной вене. Складывается впечатление, что чем выше степень сохранности печеночных клеток, тем меньше общих липидов они содержат, и наоборот. На гистологических препаратах печени кроликов, которым на фоне экспериментальной гиперхолестеринемии трансплантировали ККПП, выявлена значительно меньшая выраженность признаков дистрофии гепатоцитов относительно контроля, однако это улучшение состояния клеточных элементов печеночной паренхимы не имеет четкой структурной локализации. Содержание общих липидов, выявленное с помощью суданового черного, варьировало в пределах печеночной дольки скорее бессистемно, в виде мозаики, в целом суданофилия была незначительна.

Определение активности ферментов системы антиоксидантной защиты, а именно, каталазы и глутатионредуктазы, а также содержание восстановленного глутатиона, в гомогенатах печени кроликов контрольной группы на 28-е сутки после проведения операции выявило значительное

снижение всех показателей (таблица). В интенсивности индуцированного ПОЛ достоверных отличий, однако не наблюдалось. В группе животных, которым трансплантировали криоконсервированные гепатоциты, исследуемые показатели оставались на уровне контроля. После трансплантации клеток плодовой печени зафиксировано достоверное возрастание активности каталазы до уровня интактных животных (в 3 раза по сравнению с контролем). Глутатионредуктазная активность и содержание восстановленного глутатиона также значительно возрастали – вдвое по сравнению с контролем. Достоверных изменений в интенсивности индуцированного ПОЛ не наблюдалось. Эти данные свидетельствуют о том, что аллотрансплантация криоконсервированных клеток плодовой печени в печени реципиентов стимулирует ферментативную систему антиоксидантной защиты.

### Обсуждение

Полученные экспериментальные данные позволяют сделать вывод, что криоконсервированные гепатоциты реализуют свое биологическое действие в отношении липидов сыворотки крови на протяжении первой недели после трансплантации, снижая уровень общего ХС и ТАГ. Относительная непродолжительность эффекта может быть связана с прекращением функционирования трансплантата. Продлить срок выживания пересаженных клеток, вероятно, можно при условии использования иммуносупрессии. Биологические эффекты от введения ККПП носят двухфазный характер. Сначала наблюдается гиполипидемическое действие трансплантата в пределах первой недели после трансплантации, а затем – на третьей-четвертой неделях. Следует отметить, что отдаленные эффекты характеризуются значительно большей выраженностью. Эти данные позволяют предположить, что за эффекты, которые наблю-

Состояние антиоксидантно-прооксидантного равновесия в печени кроликов с экспериментальной гиперхолестеринемией после аллотрансплантации криоконсервированных гепатоцитов и клеток плодовой печени ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Исследуемые параметры	Норма	Контроль	Трансплантация криоконсервированных гепатоцитов	Трансплантация ККПП
Активность каталазы, мкмоль $H_2O_2$ /мг белка/мин	118,95 $\pm$ 2,71	30,19 $\pm$ 4,19*	49,66 $\pm$ 16,76*	94,30 $\pm$ 11,76*
Активность глутатионредуктазы, нмоль НАДФН/мг белка/мин	21,38 $\pm$ 3,55	5,47 $\pm$ 0,43*	7,22 $\pm$ 2,37*	11,44 $\pm$ 0,89*#
Восстановленный глутатион, мкмоль/г белка	40,15 $\pm$ 0,38	15,20 $\pm$ 1,32*	15,05 $\pm$ 3,28*	32,18 $\pm$ 0,94*#
Индуцированное ПОЛ, пмоль МДА/мг белка/мин	1,42 $\pm$ 0,01	1,60 $\pm$ 0,29	1,66 $\pm$ 0,26	2,46 $\pm$ 0,46*

Примечания: \* –  $p < 0,05$  по сравнению с нормой; # –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

дались в течение первой недели после трансплантации, ответственны, очевидно, биологически активные вещества, входящие в состав и продуцируемые КПП, такие как  $\alpha$ -фетопроtein [15], hepatic stimulatory substance [16] и др. Что касается механизмов реализации отдаленных гиполипидемических эффектов, то они могут быть обусловлены как непосредственной репопуляцией печени реципиента донорскими клетками, так и действием биологически активных веществ, которые могут синтезироваться трансплантированным материалом и инициировать восстановительные процессы в органе-мишени.

Полученные гистологические сведения показывают, что существенные структурные изменения, которые происходят в печени при проведении хирургической операции на фоне гиперхолестеринемии, могут быть частично нормализованы в течение 28 суток даже на фоне продолжающейся алиментарной гиперхолестеринемии, если внутривенно введена суспензия аллогенных криоконсервированных гепатоцитов. Эта нормализация проявляется в улучшении структурного состояния перипортальных гепатоцитов, скорее всего за счет пролиферации имеющихся в этих зонах камбиальных элементов. Анализ гистологических препаратов печени животных, которым трансплантировали КПП, указывают на улучшенное по сравнению с контрольным биоматериалом состояние печени.

Известно, что развитие экспериментальной гиперхолестеринемии сопровождается угнетением в печени активности ферментов антиоксидантной защиты, что в свою очередь приводит к секреции гепатоцитами модифицированных липопротеинов. Полученные данные свидетельствуют о том, что аллотрансплантация КПП стимулирует ферментативную систему антиоксидантной защиты в печени реципиентов.

Таким образом, установлено гиполипидемическое действие как криоконсервированных гепатоцитов, так и КПП после аллогенной трансплантации кроликам с экспериментальной гиперхолестеринемией. В обоих случаях эффекты наблюдаются на протяжении первой недели после операции. Кроме того, в случае применения плодовых клеток на третьей-четвертой неделях наблюдаются отдаленные, более выраженные, эффекты. Действие КПП не ограничивается гиполипидемическими эффектами. Через 4 недели после трансплантации наблюдается также значительная стимуляция ферментативной системы антиоксидантной защиты и улучшение состояния печеночной паренхимы реципиентов. Полученные данные свидетельствуют о целесообразности применения криоконсервированных гепатоцитов и клеток плодовой печени для коррекции гиперхолес-

теринемических состояний и могут быть использованы для разработки новых клинических подходов в лечении данной патологии.

## Литература

1. De Roos W.K., von Geusau B.A., Bouwman E. et al. Monitoring engraftment of transplanted hepatocytes in recipient liver with 5-bromo-2'-deoxyuridine // *Transplantation*. – 1997. – Vol. 27, N63 (4). – P. 513-518.
2. Onodera K., Kasai S., Mito M. Hepatocellular transplantation in rats with congenital ascorbic acid deficiency // *Nippon Geka Gakkai Zasshi*. – 1995. – Vol. 96, N5. – P. 301-308.
3. Dabeva M.D., Petkov P.M., Sandhu J. et al. Proliferation and differentiation of fetal liver epithelial progenitor cells after transplantation into adult rat liver // *Am. J. Pathol.* – 2000. – Vol. 156, N6. – P. 2017-2031.
4. Sandhu J.S., Petkov P.M., Dabeva M.D., Shafritz D.A. Stem cell properties and repopulation of the rat liver by fetal liver epithelial progenitor cells // *Am. J. Pathol.* – 2001. – Vol. 159, N4. – P. 1323-1334.
5. Климов А.Н., Никульчева Н.Г. Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения. – СПб: Питер Ком, 1999. – 512 с.
6. Ланкин В.З., Вихерт А.М. Перекисное окисление липидов в этиологии и патогенезе атеросклероза // *Архив патологии*. – 1989. – Т. 51, №1. – С. 80-85.
7. Petrenko A. Yu., Sukach A.N. Isolation of intact mitochondria and hepatocytes using vibration // *Analytical Biochem.* – 1991. – Vol. 194, № 2. – P. 326-329.
8. Petrenko A. Yu. Energetic state and metabolism of xenobiotics in isolated hepatocytes depending on cells' conditions of accomplishment and cryopreservation: Authors... doctor's degree obtaining. – Kharkov, 1993. – 314 p.
9. Климов А.Н. Причины и условия развития атеросклероза Превентивная кардиология / Под ред. Г.И. Косицкого. – М.: Медицина, 1977. – С. 260-321.
10. Королук М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., и др. Методы определения активности каталазы // *Лаб. дело*. – 1988. – №1. – С. 16-19.
11. Чернов Н.Н. Исследование глутатионредуктазы в печени крыс. Энзимология опухолей. – М.: Ун-т дружбы народов, 1979. – С.96-101.
12. Путилина Ф.Е. Определение содержания восстановленного глутатиона в тканях / В кн.: Методы биохим. исслед. / Под редакцией М.И. Прохоровой. – Л.: Изд-во Ленинград. ун-та, 1982. – С.183-185.
13. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – М.: Наука, 1972. – 252 с.
14. Кононский А.И. Липиды / В кн.: Гистохимия. – К.: Вища школа, 1976. – С.118-137.
15. Абелев Г.И.  $\alpha$ -фетопроtein (биология) // *Вестник РАМН*. – 2001. – №9. – С. 77-83.
16. Kale V.P., Limaye L.S. Stimulation of adult human bone marrow by factors secreted by fetal liver hematopoietic cells: in vitro evaluation using semisolid clonal assay system // *Stem cells*. – 1999. – Vol. 17. – P. 107-111.