

Трансплантация криоконсервированных гепатоцитов и клеток фетальной печени крысам с экспериментальным циррозом

О.В. ОЧЕНАШКО¹, Ю.В. НИКИТЧЕНКО², А.Ю. ПЕТРЕНКО¹

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²НИИ биологии Харьковского национального университета им. В.Н. Каразина

Печеночная недостаточность разного генеза – одна из ключевых проблем современной гепатологии. Для радикального лечения больных с такой патологией необходима пересадка гистосовместимой печени. Однако при существующем дефиците органов для трансплантации исследуются новые методы решения этой проблемы. В связи с этим трансплантацию изолированных клеток все чаще рассматривают как альтернативу пересадке целого органа.

Экспериментально установлено, что зрелые гепатоциты (Гц) эффективно выполняют органозаместительную функцию [9, 10], однако основной проблемой при их трансплантации является медленное деление клеток после пересадки, а также необходимость иммуносупрессии. В этом аспекте перспективный материал для трансплантологов – клетки фетальной печени (КФП) раннего срока гестации, которые имеют ряд преимуществ перед зрелыми клетками печени: высокую пролиферативную активность, низкую иммуногенность и способность дифференцироваться в специализированные клетки разных типов для компенсации метаболических нарушений. Кроме того, КФП содержат и продуцируют стадиоспецифические биологически активные соединения [15], которые могут оказывать положительное воздействие на поврежденную печень.

Важная составляющая деструктивных изменений в печени при хронических гепатитах и циррозах – нарушение регуляции перекисных процессов: активация свободнорадикального окисления, истощение антиоксидантных систем защиты [3]. Влияние аллотрансплантации криоконсервированных ГП и КФП на состояние прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза организма животных с циррозом печени практически не изучено.

Цель представленной работы – установить особенности действия криоконсервированных клеток печени разной степени зрелости на состояние систем перекисного окисления липидов и биохимические показатели крови в условиях аллотрансплантации крысам с экспериментальным циррозом.

Материалы и методы

В экспериментах использовали белых беспородных крыс. Содержание животных и экспериментальные манипуляции проводили согласно правилам “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях” (Страсбург, 1985). Все хирургические операции на животных, включая декапитацию, проводили под ингаляционным эфирным наркозом.

Клетки для трансплантации выделяли из печени взрослых 6-месячных крыс и 13-14-дневных эмбрионов крыс в стерильных условиях ферментативным методом [4] и криоконсервировали под защитой 5%-го ДМСО с использованием программного замораживания. Клеточные суспензии отогревали непосредственно перед введением. Жизнеспособность клеток после отогрева составляла не менее 60% (тест с окрашиванием трипановым синим).

Цирроз формировали путем внутрибрюшинных инъекций CCl_4 (разведение 1:1 в масле) из расчета 0,2мл/100 г дважды в неделю в течение 3 месяцев. Через 10 дней после отмены инъекций CCl_4 животным внутриселезеночно вводили КФП крыс (10 млн/0,3 мл) или Гц крыс (10 млн/0,3 мл). Контрольной группе (ложная трансплантация) внутриселезеночно вводили среду криоконсервирования клеток в эквивалентном объеме. Срок наблюдения после трансплантации (Тц) составил 4 недели.

Перед операцией и каждую неделю после Тц в сыворотке крови животных измеряли активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ), содержание альбумина (набор: Sigma, USA) и общего билирубина (ОБ) (набор: Vector-Best, Russia).

Животных выводили из опыта декапитацией через 4 недели после трансплантации, печень извлекали, охлаждали и выделяли постмитохондриальную фракцию.

Об активности перекисных процессов судили по содержанию гидроперекисей липидов (ГПЛ) в плазме крови [7] и постмитохондриальной фракции печени [6].

Состояние антиоксидантных систем оценивали по изменению антиокислительной активности (АОА) плазмы крови и активности антиоксидантных ферментов печени. АОА плазмы крови определяли по способности плазмы тормозить накоп-

Адрес для корреспонденции: Оченашко О.В., 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

ление ТБК-активных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в суспензии желточных липопротеидов [1]. Активность Se-зависимой глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в постмитохондриальной фракции печени определяли спектрофотометрически по убыли NADPH [2], активность каталазы – по убыли H_2O_2 [12], активность супероксиддисмутазы – как описано в [8]. Все измерения проводили на спектрофотометре “Specord UV VIS” при 37°C.

Содержание белка в гомогенатах печени определяли по методу Лоури в модификации Миллера.

Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием критерия Манна-Уитни [5]. Результаты считали достоверными при условии $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В процессе формирования экспериментальной хронической патологии печени погибло 40 % животных, что типично для этой модели [13]. Морфологический контроль сформированной экспериментальной модели проводили через 10 дней после окончания курса инъекций CCl_4 . На гистологических срезах печени, окрашенных гематоксилином и эозином, наблюдались серьезные патологические изменения органа: нарушение трабекулярной структуры печеночных сегментов, фиброз, воспаление. Таким образом, отмечались все признаки развитого цирроза.

Экспериментальные животные находились под наблюдением в течение 4 недель после внутриселезеночной инъекции. Восстановительный период наиболее тяжело протекал у животных с ложной трансплантацией (контрольная группа), где выживаемость была самой низкой и составляла 67%. Выживаемость крыс с циррозом печени существенно увеличивалась при трансплантации КФП (до 88%), а введение Гц предотвращало их гибель полностью.

Исследование биохимического профиля сыворотки крови у животных с циррозом печени перед внутриселезеночным введением выявило значительные изменения, свидетельствующие о функциональных и некротических нарушениях печени. В этот период содержание альбумина было снижено в 1,5 раза ($p < 0,05$), активность ЛДГ и содержание общего билирубина увеличены в 2,4 ($p < 0,05$) и 2 ($p < 0,05$) раза по сравнению с соответствующими показателями интактных животных (альбумин $42,8 \pm 2,5$ г/л; ЛДГ 234 ± 30 Е/л; билирубин $7 \pm 0,6$ мкмоль/л).

Изучение биохимических показателей крови после трансплантации выявило следующие изменения. Содержание альбумина в контрольной группе через 1 неделю после ложной трансплантации

снижалось на 30 % по сравнению с исходным уровнем, а затем постепенно возрастало. Через 4 недели этот показатель составлял $27 \pm 3,2$ г/л (рис. 1). Было установлено, что после трансплантации аллогенных криоконсервированных клеток независимо от степени их зрелости уровень альбумина увеличивался на 50 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем уже через 1 неделю после введения. При этом у группы животных, которым вводили Гц, этот показатель оставался на одном уровне до конца срока наблюдения – через 4 недели содержание альбумина составляло $30,4 \pm 2,4$ г/л. Трансплантация КФП проявляла свое максимальное действие в отношении данного показателя на 3-4 неделе, когда уровень альбумина достигал $36 \pm 1,2$ г/л ($p < 0,05$ по отношению к контролю).

Активность ЛДГ в контрольной группе оставалась в 2,7-1,7 раза выше, чем у интактных животных в течение всего срока наблюдения. При введении Гц изменение активности фермента имело волнообразный характер: через 2 недели после трансплантации активность ЛДГ была в 1,7 раза ниже, чем в контроле, а через 4 недели достоверно от него не отличалась. Динамика активности фермента после трансплантации КФП имела сходный характер.

Содержание общего билирубина в контрольной группе не изменялось через 1 неделю после операции, а затем постепенно снижалось, оставаясь при этом достоверно выше, чем у интактных животных. Трансплантация гепатоцитов эффективно снижала уровень билирубина через 1 неделю

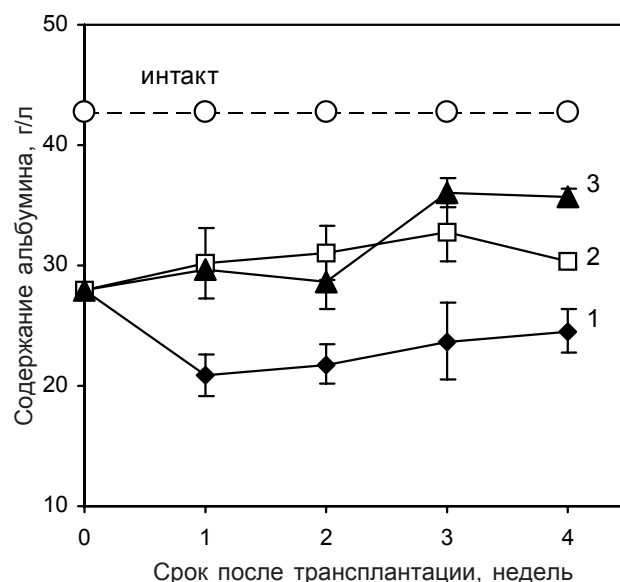


Рис. 1. Динамика содержания альбумина в сыворотке крови крыс с экспериментальным циррозом в контроле (ложная трансплантация) (1), после аллотрансплантации криоконсервированных гепатоцитов (2) и клеток фетальной печени (3).

на 40% ($p < 0,05$), а затем значение этого показателя существенно не отличалось от контроля. Введение КФП не оказывало значительного влияния на изменение этого показателя.

Известно, что развитие цирроза печени, индуцированное введением малых доз тетрахлорметана, сопровождается активацией свободнорадикальных процессов в тканях и изменением статуса антиоксидантных систем. Влияние Гц и КФП на состояние прооксидантно-антиоксидантного равновесия в организме крыс исследовали через 4 недели после их трансплантации.

Содержание гидроперекисей липидов (ГПЛ) в плазме крови крыс контрольной группы через 4 недели было почти в два раза выше, чем у интактных животных, а АОА крови была снижена в 2,7 раза. Эти данные свидетельствуют о значительном нарушении прооксидантно-антиоксидантного равновесия в организме животных с экспериментальным циррозом. Введение криоконсервированных Гц и КФП приводило к достоверному снижению уровня ГПЛ в крови в 1,46 раза ($p < 0,05$). При этом отмечено увеличение АОА крови после введения Гц и КФП в 1,9 ($p < 0,05$) и 2,1 ($p < 0,05$) раза соответственно. Таким образом, трансплантация Гц и КФП приводит к снижению уровня ПОЛ в крови животных и усилению активности неферментативной антиоксидантной системы.

Содержание ГПЛ в постмитохондриальной фракции печени через 4 недели после ложной операции было практически в 5 раз больше, чем у интактных животных (рис. 2). Трансплантация клеток эффективно снижала уровень ПОЛ в печени. При этом более выраженный эффект достигался при введении КФП – содержание ГПЛ при таком варианте воздействия снижалось в 3,47 раза ($p < 0,05$).

Состояние ферментативной антиоксидантной системы печени оценивали по изменению активности каталазы, глутатион-редуктазы, глутатионпероксидазы и супероксиддисмутазы. Как показали исследования, развитие цирроза сопровождалось угнетением активностей всех изучаемых ферментов. Эти изменения наиболее четко прослеживались при изучении каталазной и глутатионредуктазной активностей, которые снижались в 2,39 и 3,54 раза соответственно. Полученные данные свидетельствуют об ослаблении ферментативной защиты клеток печени от реакций свободнорадикального окисления в условиях выраженной активности патологического процесса.

Введение Гц и КФП оказывало позитивный однонаправленный эффект на состояние ферментативной антиоксидантной системы печени. При этом степень увеличения активности некоторых ферментов зависела от варианта воздействия.

Активность каталазы – фермента, участвующего в детоксикации перекиси водорода, достоверно увеличивалась по сравнению с контролем на 60% после трансплантации КФП. Введение Гц приводило к незначительному изменению активности этого фермента. Трансплантация КФП вызывала увеличение глутатионпероксидазной активности на 80% ($p < 0,05$). Увеличение активности этого фермента после введения КФП было незначительным.

Результаты работы демонстрируют, что введение малых доз тетрахлорметана в течение 3-х месяцев приводит к типичным для экспериментального цирроза морфологическим и биохимическим изменениям в печени [13]. В группе с ложной трансплантацией биохимические показатели крови свидетельствуют о значительных функциональных и некротических изменениях в печени животных как минимум в течение 5 недель (начальный 10-ти дневный период после прекращения введения CCl_4 и 4 недели после ложной трансплантации). Изучение прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза печени и крови животных контрольной группы также свидетельствуют о нарушении системы регуляции перекисных процессов. Эти данные подтверждают, что после отмены CCl_4 восстановительные процессы в органе, пораженном циррозом, развиваются медленно, и поэтому требуют дополнительной поддержки и стимуляции.

Внутрибелочечная трансплантация Гц и КФП проводилась с целью поддержания функции печени и восстановления ее гомеостаза. На моделях у

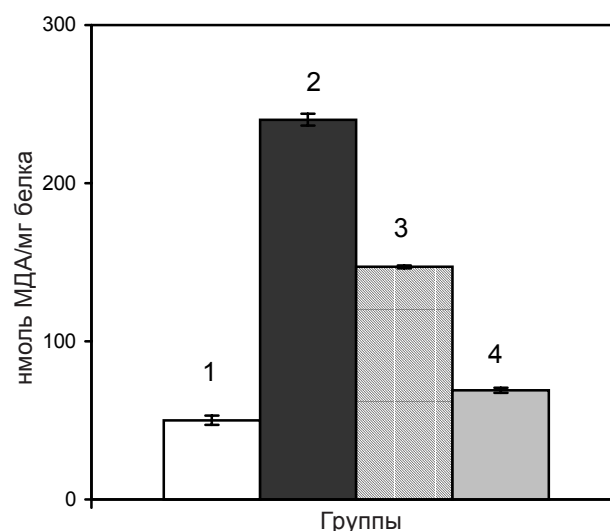


Рис. 2. Содержание гидроперекисей липидов в постмитохондриальной фракции печени интактных крыс (1) и у животных с экспериментальным циррозом через 4 недели после ложной трансплантации (контроль) (2), аллотрансплантации криоконсервированных гепатоцитов (3) или клеток фетальной печени (4).

животных было показано, что гепатоциты, введенные в пульпу селезенки, способны перемещаться через портальную вену в печень (при этом часть клеток остается в селезенке и может выживать там в течение длительного времени) [11]. Большинство исследований в этом направлении было выполнено с использованием зрелых гепатоцитов. Наша работа отличается тем, что в качестве одного из вариантов введения использовали КФП и не применяли иммуносупрессию.

Классические работы по трансплантологии рассматривают введение зрелых клеток печени как эффективный способ коррекции печеночной недостаточности. В работе [10] приведены данные о поддержке функции печени сингенными гепатоцитами крыс, введенными в селезенку животных с декомпенсированным циррозом печени. Такое воздействие приводило к увеличению продолжительности жизни крыс, а положительная динамика биохимических показателей коррелировала с количеством гепатоцитов, гистологически выявляемых в селезенке. Описанные эффекты были установлены в условиях использования сингенной трансплантации, при которой трансплантированные клетки не отторгаются. В нашей работе иммуносупрессия не применялась. Однако полученные данные позволяют предположить, что в течение 1 недели после трансплантации введенные гепатоциты оказывают временную эффективную метаболическую поддержку пораженного органа. В этот период была отмечена положительная динамика биохимических показателей крови, отражающих функциональное состояние печени: максимальное снижение уровня билирубина и увеличение содержания альбумина в сыворотке наблюдали через 1 неделю после трансплантации. Восстановление показателей, характеризующих прооксидантно-антиоксидантное состояние печени и крови крыс через 4 недели после введения клеток, по-видимому, свидетельствует о генерализованном позитивном эффекте действия трансплантации криоконсервированных ГЦ, который сохраняется и после прекращения функционирования клеток. Использование для трансплантации криоконсервированных гепатоцитов, возможно, также имеет преимущества, поскольку при адекватных условиях замораживания у гепатоцитов удается сохранить на достаточном уровне некоторые гепатоспецифические функции, а сама процедура криоконсервирования иногда рассматривается как модуляция иммуногенности клеток [14].

При трансплантации криоконсервированных КФП значительный органозаместительный эффект на ранних этапах после введения невозможен, поскольку фетальная печень этого срока гестации не содержит зрелые специализированные гепато-

циты. Это косвенно подтверждается данными биохимических исследований: максимальное содержание альбумина в сыворотке крови наблюдалось к концу эксперимента – через 4 недели после трансплантации, а содержание продуктов ПОЛ в печени в этот период было достоверно ниже, чем при использовании ГЦ. Более выраженное действие КФП на изменение этих показателей, возможно, отражает реализацию их пролиферативно-дифференцировочного потенциала.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что в результате введения в селезенку суспензий криоконсервированных клеток печени течение экспериментально вызванного CCl_4 -индуцированного цирроза облегчается. Позитивное воздействие введенных клеток на пораженную печень обусловлено восстановлением активности антиоксидантных систем организма. При этом максимальный и долгосрочный эффект достигается при введении криоконсервированных клеток фетальной печени. Для детальной интерпретации полученных данных необходимо проведение дополнительных экспериментов, позволяющих выявить возможную локализацию введенных клеток, а также их способность выживать в организме реципиента.

Литература

1. Клебанов Г.И., Бабенкова И.В., Теселкин Ю.О. и др. Оценка антиокислительной активности плазмы крови с применением желточных липопротеидов // Лаб. дело.– 1988.– №5.– С. 59-62.
2. Лемешко В.В., Никитченко Ю.В., Ланкин В.З. Ферменты утилизации гидропероксидов и O_2 // Бюл. эксперим. биол. и мед.– 1985.– Т. ХСІХ, №5.– С. 563-565.
3. Логинов А.С., Матюшин Б.Н., Ткачев В.Д. Энзимная форма дисмутации активных форм кислорода печени при хроническом поражении гепатобилиарной системы // Вопросы мед. химии.– 1991.– №1.– С. 31-33.
4. Петренко А.Ю., Сукач А.Н., Росляков А.Д. и др. Выделение гепатоцитов крыс неферментативным методом: детоксикационная и дыхательная активности // Биохимия.– 1991.– Т. 56, №9.– С. 1647-1651.
5. Платонов А.Е. Статистический анализ в биологии и медицине: задачи, терминология, компьютерные методы.– М.: Из-во РАМН, 2000.– 52 с.
6. *Современные методы в биохимии* / Под ред. В.Н. Ореховича.– М., 1977.
7. Asakawa T., Matsushita S. Coloring condition of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxide // Lipids.– 1980.– Vol. 15.– P. 137-140.
8. Beauchamp C., Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // Anal. Biochem.– 1971.– Vol. 44.– P. 276-287.
9. Fuller B.J. Transplantation of isolated hepatocytes // Hepatology.– 1988.– Vol. 7.– P. 368-373.
10. Kobayashi N., Ito M., Nakamura J. et al. Hepatocyte transplantation improves liver function and prolongs survival in rats with decompensated liver cirrhosis. // Transpl. Proc.– 1999.– Vol. 31.– P. 428-429.

11. *Lee S., Wang X., Chowdury N., Chowdhury J.* Hepatocyte transplantation: state of the art and strategies for overcoming existing hurdles // *Ann. Hepatol.* – 2004. – Vol. 3. - P.48-53.
12. *Marklund S., Nordensson I., Bäck O.* Normal Cu-Zn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathion peroxidase in Werners syndrome // *J. Gerontol.*– 1981.– Vol. 36, №4.– P. 405-409.
13. *Muriel P.* Nitric oxide protection of rat liver from lipid peroxidation, collagen accumulation, and liver damage induced by carbon tetrachloride // *Biochem. Pharmacol.*– 1998.– Vol. 56.– P. 773-779.
14. *Ostrowska A., Karrer F.M., Bilir B.M.* Histological identification of purified and cryopreserved allogeneic hepatocytes following transplantation in a murine model without host immunosuppression // *Transpl. Int.*– 1999.– Vol. 12, №3.– P. 188-194.
15. *Zwicky C., Geber S., Gasparini P.* Preparation and analysis of fetal liver extracts // *Bone marrow transplant.*– 2000.– Vol. 26.– P. 667-671.