

Перспективы применения биорегуляторов стволовых клеток при трансплантации печени

Д.В. Черкашина¹, Е.Н. Ткачева¹, А.Ю. Сомов¹, О.А. Семенченко¹, А.Ю. Петренко¹, Б.Дж. Фуллер²

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

²Royal Free University College Medical School, London, United Kingdom

Актуальной проблемой современной трансплантологии остается ограниченность сроков между получением печени и ее трансплантацией, что обусловлено невозможностью долгосрочного хранения органа *ex vivo* без потери его функциональной активности и жизнеспособности. Гипотермия, как метод замедления интенсивности метаболизма, является основным и достаточно надежным способом сохранения печени, но сроки ее безопасного использования лимитируются 10–16 часами, пролонгирование приводит к необратимым нарушениям метаболических процессов и к развитию повреждения органа, в частности энергетического и прооксидантно-антиоксидантного баланса [9, 10].

Совершенствование методов гипотермического хранения (ГХ) печени привело к разработке ряда консервирующих растворов, в состав которых входит сбалансированное количество разнообразных ионов и биологически активных добавок, присутствие которых направлено на снижение степени повреждения органа. В настоящее время наиболее распространенным и эффективным является раствор Университета Висконсин (UW) однако, его широкое применение ограничивается дороговизной. В ИПКиК НАН Украины также был разработан консервирующий сахарозо-содержащий раствор (ССР) [5], эффективность возможного использования которого была оценена в серии сравнительных экспериментов. Однако в настоящее время путь совершенствования консервирующих растворов не приводит к решению проблем, относящихся к сохранению жизнеспособности изолированной печени после долгосрочной гипотермии и ишемии. Для качественного перехода необходим поиск принципиально новых подходов. Одним из таких подходов может быть направленная регуляция клеточного метаболизма, которая способна придавать устойчивость органу к последующему экстремальному воздействию. Перспективным направлением представляется предобработка донорского организма путем введения разнообразных биологически активных веществ *in vivo* до изоляции печени и ее дальнейшего ГХ.

Адрес для корреспонденции: Черкашина Д.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

Ранее нами было показано гепатопротекторное действие цитозоля эмбриональных тканей человека, который использовали для предобработки животных, отравленных тетрахлорметаном [6]. В связи с этим представлялось перспективным использование ЦЭТ, содержащего биорегуляторы стволовых клеток (БСК), при подготовке донора перед изоляцией печени и ее последующем гипотермическом хранении.

Таким образом, целью настоящей работы было: провести сравнительную оценку эффективности двух консервирующих растворов на основании показателей энергетического и прооксидантно-антиоксидантного состояния печени; изучить влияние предобработки животных БСК на указанные параметры, а также определить возможные механизмы реализации их действия.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на белых беспородных крысах-самках массой 200-250 г (n=36), содержащихся в стандартных условиях вивария ИПКиК НАНУ. Эксперименты осуществляли в соответствии с правилами “Европейской конвенции защиты позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях” (Страсбург, 1985). Все манипуляции с животными, включая декапитацию, проводили под поверхностным эфирным наркозом.

В данной работе было проведено две серии экспериментов:

– сравнительная оценка энергетического и прооксидантно-антиоксидантного состояния печени в ходе ГХ с использованием двух консервирующих растворов – UW или ССР. В этом случае контролем служила только интактная изолированная печень; животных не подвергали какому-либо воздействию;

– изучение влияния предобработки животных БСК на указанные параметры. Крысы были разделены на следующие группы: 1 – интактная, 2 – контрольная (животным за 4 ч до изоляции органа внутривенно вводили 0,9% NaCl (0,3 мл/100 г массы)), 3 – опытная, введение БСК (0,3 мл/100 г массы).

Эмбрионы 9-12 недель гестации были получены после письменного разрешения донора в результате планового прерывания беременности. В ка-

честве источника БСК использовали цитозоль эмбриональных тканей человека (содержание белка $1 \pm 0,25$ мг/мл), который получали путем высокоскоростного ультрацентрифугирования (105 000g, 90 минут) 40%-го гомогената мягких тканей эмбриона. Все работы проводили в стерильных условиях на холоде. БСК хранили при -30°C .

Для изоляции органа животных забивали, брюшную полость вскрывали, печень промывали от крови и насыщали консервирующим раствором *in situ* через *v. porta* ($T=0...4^{\circ}\text{C}$). Для гипотермического хранения органа в работе были использованы среды UW или ССР. После окончания перфузии в портальную вену вводили катетер, печень изолировали и помещали в консервирующий раствор. Орган хранили в течение 1 или 24 ч в холодильнике при температуре 4°C .

В 20%-ных гомогенатах печени исследовали спектрофотометрически ("Сагу-50") следующие показатели: содержание АТФ [7], базальный уровень ТБК-активных продуктов [1], интенсивность индуцированного ПОЛ по скорости накопления ТБК-активных продуктов в прооксидантном буфере [2]. Активности ферментов определяли: каталазную по убыли H_2O_2 при 240 нм [3]; глутатионпероксидазную по приросту содержания окисленного глутатиона при 260 нм [11]; пируваткиназную по убыли количества НАДН в сопряженной лактатдегидрогеназной реакции [13].

Митохондрии выделяли при помощи дифференциального центрифугирования по методу [4] с незначительной модификацией. Конечная суспензия митохондрий содержала 40-50 мг белка. Оценка дыхательных параметров митохондрий выполнялась с помощью закрытого платинового электрода Кларка в термостатируемой ячейке объемом 1 мл при 26°C на полярографе "Rank Brother" model 20, (Великобритания), соединенном с персональным компьютером. Остаточный кислород электрода не превышал 5-6 %. Расчет скоростей потребления кислорода выполнялся с помощью прикладного программного обеспечения. Добавка митохондрий составляла 1,5-2,5 мг белка. Субстратами дыхания служили малат (5мМ), глутамат (5мМ) или сукцинат (8 мМ). Окислительное фосфорилирование инициировали добавкой АДФ (250 мМ), разобщение дыхания и фосфорилирования вызывали 2,4-динитрофенолом (100 мМ).

Кроме того, в гомогенатах и постмитохондриальных фракциях печени оценивали активность окислительно-восстановительных ферментов по восстановлению флуоресцентного красителя Alamar Blue (AB), используя планшетный флуориметр "Tecan"[8].

Содержание белка определяли биуретовым методом.

Статистическую обработку результатов осуществляли при помощи компьютерного пакета программ "Statistica v.5.5". Данные оценивали, используя непараметрический критерий Манна-Уитни, выражали в виде $M \pm m$. Достоверно отличными считали результаты при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Известно, что поддержка энергетической функции является важным гомеостатическим параметром во время хранения печени. Нарушение функционирования митохондрий, в частности уменьшение дыхательного контроля и увеличение скорости поглощения кислорода митохондриями, является одним из важнейших показателей негативного влияния охлаждения и гипоксии [10]. Кроме того, повреждение митохондрий приводит к усилению внутриклеточного оксидативного стресса, вследствие чего повышается интенсивность свободно-радикальных процессов в клетках печени [9]. Таким образом, изучение энергетического и прооксидантно-антиоксидантного состояния органа в условиях ГХ позволяет оценить эффективность применения консервирующего раствора.

ГХ печени ГЗ в течение 24 ч, независимо от вида консервирующего раствора, приводило к двукратному снижению содержания АТФ в печени относительно 1 ч хранения (50% – UW, 49% – ССР).

Уже после 1 ч ГХ наблюдалось значительное достоверное повышение скорости дыхания митохондрий. Малат-глутамат-стимулированное дыхание повышалось более чем в 2 раза относительно интактной группы. АДФ вызывал увеличение скорости V_3 в случае ССР и UW на 110 и 50% соответственно. Внесение в среду измерения восстановленного цитохрома С после разобщителя не влияло на скорость дыхания. Дыхательный контроль митохондрий после 1 ч ГХ снижался в 1,7 раза независимо от типа консервирующего раствора. Продление срока ГХ до 24 ч способствовало дальнейшему уменьшению дыхательного контроля в 3 раза относительно интактной группы и в 1,8 раза по сравнению с 1 ч хранения как в UW, так и в ССР. Скорость гидролиза АТФ после 1 ч ГХ не изменялась независимо от типа раствора. Олигомицин одинаково эффективно ингибировал АТФазную активность митохондрий до 5% от начального уровня. Пролонгирование срока ГХ до 24 ч значительно влияло на скорость гидролиза АТФ, что проявлялось в снижении общей активности АТФазы, а также в достоверном повышении олигомицин-нечувствительного катализа. Такая динамика наблюдалась как для UW, так и для ССР.

Изучение прооксидантно-антиоксидантного баланса в печени при ГХ показало, что 1 ч хранения

как в ССР, так и в UW приводил к повышению в 1,5 раза базального уровня ТБК-активных продуктов, но не влиял на скорость их накопления. Кроме того, наблюдалось достоверное снижение каталазной активности до 55-60% и тенденция к снижению глутатионпероксидазной (72-75%) относительно интактной группы. Такая динамика сохранялась в обеих группах при продлении сроков ГХ до 24 ч.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что уже после 1 ч ГХ наблюдаются нарушения энергетического и прооксидантно-антиоксидантного состояния печени, которые усиливаются при пролонгировании сроков хранения до 24 ч. Проведенные эксперименты демонстрируют отсутствие различий между изученными показателями при ГХ органа в растворах UW и ССР, что является достаточным обоснованием для использования ССР в качестве консервирующего раствора при трансплантации печени. Для коррекции наблюдаемых в ходе ГХ нарушений метаболических процессов возникла необходимость в принципиально ином подходе, а именно предобработке крыс БСК за 4 ч до изоляции органа. В качестве консервирующей среды использовали ССР.

Предварительное введение БСК приводило к значительному (в 2,5 раза) ингибированию скорости накопления ТБК-активных продуктов, по сравнению как с контрольной, так и интактной группой. При этом наблюдалась нормализация базального уровня ТБК-активных продуктов, который увеличивался в контроле уже после 1 ч хранения. Аналогичная динамика наблюдалась при продлении сроков ГХ до 24 ч. Предобработка БСК имела положительное влияние на активность основных ферментов антиоксидантной системы: после 1 ч хранения печени активность каталазы была достоверно выше в 1,5 раза, а глутатионпероксидазы в 1,2 раза, что соответствовало уровню интактной группы. Было обнаружено, что продление сроков хранения печени до 24 ч не влияло на эффекты предобработки.

При изучении общего количества АТФ было установлено, что предобработка БСК приводит к его значительному повышению до 160% относительно контрольной группы после 1 ч ГХ. Такое увеличение оказалось краткосрочным, продление срока хранения до 24 ч вызывало резкое падение уровня АТФ до значений контрольной группы.

Известно, что одним из основных источников энергии во время ГХ является анаэробный гликолиз. Полученные результаты вызвали необходимость оценить возможный вклад этого пути в поддержку уровня АТФ под действием БСК. Была изучена активность ключевого, АТФ-генерирующего фермента гликолиза – пируваткиназы. Установлено, что в контрольной группе после 1 ч

ГХ пируваткиназная активность уменьшается в 2 раза по сравнению с исходным уровнем. Предобработка ЦЭТ приводит к восстановлению активности (контроль – $21,57 \pm 3,1$; опыт – $44,4 \pm 3,0$ нмоль АТФ/мг белка за 1 мин). Таким образом, можно утверждать, что значительный вклад в поддержку уровня АТФ вносит гликолитический путь, однако необходимо отметить, что его чрезмерная активация связана с развитием лактоацидоза, нарушением работы ряда внутриклеточных ферментов, ионным дисбалансом. Другим возможным механизмом поддержания пула макроэргов является функционирование митохондриальной электрон-транспортной цепи, однако известно, что при гипоксии происходят нарушения ее работы, обусловленные рассеиванием мембранного потенциала и потерей респираторной функции [12].

Было установлено, что уровень сукцинат-зависимого дыхания в состоянии V3 по Чансу и V4 значительно выше в группе БСК-предобработанных животных по сравнению с контролем как до, так и после 1 ч ГХ. В присутствии малата и глутамата подобных изменений не наблюдалось. Кроме того, для оценки вклада различных компартментов клеток печени в поддержание окислительно-восстановительного равновесия в условиях предобработки БСК было проведено исследование интенсивности флуоресценции красителя Alamar Blue, накопление восстановленной формы которого пропорционально активности редокс-ферментов [8]. Раздельное определение данного показателя для гомогенатов печени и постмитохондриальной фракции показало, что около 90% прироста прямо зависит от митохондриальной функции. Немитохондриальный компонент восстановления Alamar Blue оказался тесно связанным с гликолизом. Так, при использовании его ингибитора – моноиоацетата – флуоресценция красителя в постмитохондриальной фракции практически полностью подавлялась. При этом в условиях предобработки животных БСК вклад немитохондриального и негликолитического пути в восстановление Alamar Blue увеличивался в 5 раз.

Таким образом, на основании полученных результатов можно предположить, что реализация эффектов БСК тесно связана с системами, трансформирующими энергию, и краткосрочное накопление АТФ после предобработки является достаточным для поддержания печени в условиях холодовой ишемии. Нормализация прооксидантно-антиоксидантного баланса, наблюдаемая на фоне этого повышения, свидетельствует в пользу возможного позитивного посттранскрипционного и посттрансляционного регуляторного действия БСК на активности ферментов системы антиоксидантной защиты путем передачи сигналов с вовлечением

макроэргов. В свою очередь, возможные механизмы генерации АТФ после предобработки БСК могут базироваться на следующих позициях: во-первых, гипоксические условия создают предпосылки для компенсаторного окисления в электрон-транспортной цепи митохондрий ФАД-зависимых субстратов в отличие от НАД-зависимых. Существует вероятность активации сукцинатдегидрогеназы под действием БСК, в пользу чего свидетельствуют показатели дыхания. Во-вторых, обнаруженное повышение вклада негликолитического восстановления Alamar Blue в условиях предобработки демонстрирует возможную активацию ферментов, принимающих участие в челночном транспорте субстратов и восстановительных эквивалентов для генерации АТФ. Наблюдаемые изменения позволяют предполагать, что предобработка БСК стимулирует реализацию ранних адаптационных механизмов в печени, находящейся в условиях холодной ишемии.

Выводы

1. Сахарозо-содержащий раствор, разработанный в ИПКиК, демонстрирует степень сохранности печени на уровне общепринятого UW, что было оценено по энергетическому и прооксидантно-антиоксидантному состоянию органа после 1 или 24 ч ГХ.

2. Предобработка животных БСК приводит к нормализации прооксидантно-антиоксидантного баланса и пируваткиназной активности на фоне значительного повышения уровня АТФ, стимуляции сукцинат-зависимого дыхания митохондрий, а также увеличения негликолитической активности постмитохондриальной фракции, что свидетельствует о взаимозависимости регуляторных эффектов БСК и систем, трансформирующих энергию и поддерживающих окислительно-восстановительное равновесие.

Литература

1. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Жибица Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма.— СПб.: ИКС "Фолиант", 2000.— 200 с.
2. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.— М.: Наука, 1972.— 252 с.
3. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело.— 1988. — №1.— С.16-19.
4. Мосолова И.М., Горская И.А., Шольц К.Ф. и др. Выделение интактных митохондрий из печени крыс.— В кн. : Методы современной биохимии.— М.: Наука.— 1975.— С. 45– 47.
5. Пат. 57680 А (Україна) МПК⁷ А01№1/02. Середовище для гіпотермічного зберігання ізольованої печінки / О.А. Семенченко, І.В. Шаніна, О.Ю. Петренко. Заявлено 05.11.2002. Публ.16.06.2003. Бюл.№6.
6. Черкашина Д.В., Петренко О.Ю., Оченашко О.В. Захист печінки від гострого отруєння тетрахлорметаном препаратами ембріонального походження // Трансплантологія.— 2003.— Т.4, №1 — С. 49-50.
7. Adams H. Adenosine 5'-triphosphate determination with phosphoglycerate kinase: In Methods of enzymatic analysis / Ed. Bergmeyer H.U.— New York: Academic Press, 1963.— P. 539-543.
8. Fields R.D., Lancaster M.V. Dual-attribute continuous monitoring of cells proliferation/cytotoxicity // Am. Biotechnol. Lab.— 1993.— Vol. 11.— N5.— P. 48-50.
9. Jaeschke H. Reperfusion injury after warm ischemia or cold storage of the liver: role of apoptotic cell death // Transplant.Proceed.— 2002.— Vol.34, N7.— P. 2656-2658.
10. Mitchell S.J., Churchill T.A., Winslet M.C. et al. Energy metabolism following prolonged hepatic cold preservation: benefits of interrupted hypoxia on the adenine nucleotide pool in rat liver // Cryobiology.— 1999.— Vol. 39, N2.— P. 130-137.
11. Rotruck J.T., Pope A.L., Ganther H.E. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase // Science.— 1973.— Vol.179, N73.— P. 588-590.
12. Sammut I.A., Thorniley M.S., Simpkin S. et al. Impairment of hepatic mitochondrial respiratory function following storage and orthotopic transplantation of rat livers // Cryobiology.— 1998.— Vol. 36, N1.— P. 49-60.
13. Tietz A., Ochoa S. "Fluorokinase" and pyruvic kinase // Arch. Biochem. Biophys.— 1958.— Vol. 78.— P. 477-493.