

## Течение экспериментальной гиперхолестеринемии после аллотрансплантации криоконсервированных гепатоцитов

А.С. ЛЕБЕДИНСКИЙ, А.Ю. ПЕТРЕНКО, А.Н. СУКАЧ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Proceeding of Experimental Hypercholesterolemia After Cryopreserved Hepatocyte Allograft Transplantation

LEBEDINSKIY A.S., PETRENKO A.YU., SUKACH A.N.

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

В работе изучалось действие криоконсервированных гепатоцитов на обмен липидов при аллотрансплантации кроликам с экспериментальной гиперхолестеринемией (ГХ). Показано, что криоконсервированные изолированные гепатоциты способны оказывать значительное регулирующее действие на липидный обмен, однако отмеченные эффекты ограничиваются первой неделей наблюдения.

**Ключевые слова:** экспериментальная гиперхолестеринемия кроликов, криоконсервированные гепатоциты, аллогенная трансплантация, липидный обмен, холестерин.

У роботі вивчалася дія криоконсервованих гепатоцитів на обмін ліпідів при алотрансплантації кролям з експериментальною гіперхолестеринемією. Показано, що криоконсервовані ізольовані гепатоцити здатні спричинити значну регулюючу дію на ліпідний обмін, але ефекти, що відзначаються, обмежені першим тижнем спостереження.

**Ключові слова:** експериментальна гіперхолестеринемія кролів, криоконсервовані гепатоцити, алогенна трансплантація, ліпідний обмін, холестерин.

The effect of cryopreserved hepatocytes on lipid metabolism under allotransplantation to rabbits with experimental hypercholesterolemia (HC) was studied in this work. It was demonstrated, that the cryopreserved isolated hepatocytes were capable to cause a significant regulatory effect on lipid metabolism, but the noted effects were limited by the first week of observation.

**Key-words:** rabbit's experimental hypercholesterolemia, cryopreserved hepatocytes, allogenic transplantation, lipid metabolism, cholesterol

Среди многочисленных работ, посвященных изучению обмена липидов, значительное место занимают исследования ГХ, которая наблюдается при ряде заболеваний человека и сопряжена с риском развития атеросклероза [2]. Тяжесть данного состояния в большой степени зависит от соотношения в крови главных транспортных форм липидов – липопротеинов и распределения холестерина (ХС) между атерогенными и антиатерогенными фракциями липопротеинов. Особое значение в развитии ГХ имеет активность протекания свободно-радикальных процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ).

Печень – основное регуляторное звено в обмене липидов и липопротеинов, поэтому нормальное выполнение ею липорегуляторной функции – очень важный фактор в коррекции состояний ГХ. Традиционной экспериментальной моделью таких состояний является алиментарная ГХ кроликов, развитие которой характеризуется значительным повышением содержания ХС в крови, за счет многократного повышения содержания атерогенных липопротеинов, в частности липопротеинов низкой плотности (ЛПНП). При этом наблюдается

The investigations of HC, observed at some human diseases and related to the risk of atherosclerosis development, take a considerable place among the numerous works, devoted to the lipid metabolism study [2]. The severity of this state depends in a greater extent on the ratio of the major transport forms of lipids in blood: lipoproteins and cholesterol (CS) distribution between atherogenic and antiatherogenic lipoprotein fractions. The proceeding activity of lipid peroxidation (LPO) free-radical processes is of special importance at the HC development.

The liver is the principal regulatory link in the lipid and lipoprotein metabolism, therefore its normal liporegulatory function performance is an important factor when correcting the HC state. The traditional experimental model of such states is the alimentary HC of rabbits, which development is characterised by a considerable increase in HC content in blood, due to a multiple augmentation of atherogenic lipoprotein content, in particular, lipoproteins of low density (LLD). In this case there is observed the activation of LPO processes, accompanying by an increase in the concentration of peroxide-modified forms of lipoproteins in blood [4].

**Адрес для корреспонденции:** Лебединский А.С., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 7720135, факс: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

**Address for correspondence:** Lebedinskiy A.S., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7720135, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

активация процессов ПОЛ, сопровождающаяся нарастанием концентрации перекисно-модифицированных форм липопротеинов в крови [4].

Последние десятилетия активно изучается возможность трансплантации изолированных клеток печени. Было показано, что в организме реципиента при условии использования адекватной иммуносупрессии они способны длительно выживать, выполнять гепатоспецифические функции и даже делиться [11, 12]. Центральная роль, которую печень играет в обмене липидов и развитии его расстройств [2], может рассматриваться как достаточное основание для изучения возможности коррекции дислипидемических состояний путем трансплантации клеток печени. Возможности клинического применения клеток печени значительно расширяются с разработкой методов их низкотемпературного консервирования и хранения, поэтому наиболее целесообразно рассмотреть на экспериментальной модели именно использование криоконсервированного материала.

Цель настоящей работы – изучение действия криоконсервированных гепатоцитов на обмен липидов при аллотрансплантации кроликам с экспериментальной ГХ.

### Материалы и методы

Эксперименты проводили на зрелых беспородных кроликах-самцах массой 2-3,5 кг. Для создания модели экспериментальной ГХ животных содержали на стандартном рационе вивария и ежедневно вводили *per os* по 0,5 г ХС в сутки.

Гепатоциты кроликов выделяли неферментативным методом [15], криоконсервировали по трехэтапной программе замораживания под защитой 5%-го диметилсульфоксида [14] и хранили в условиях низкотемпературного банка при  $-196^{\circ}\text{C}$ . Жизнеспособность клеток печени определяли по устойчивости к окрашиванию трипановым синим [17], концентрацию клеток подсчитывали в камере Горяева [7].

Через 5 мес холестерина диеты животных разбили на две группы ( $n=5$ ). Первой группе интрапортально вводили 20 мл суспензии, содержащей  $10^8$  криоконсервированных аллогенных гепатоцитов. Вторую группу (контрольную) подвергали ложной операции, при которой в портальную вену вводили 20 мл среды Хенкса. При подборе доз трансплантируемых клеток руководствовались данными [10, 12, 18].

Трансплантацию клеточных суспензий производили внутривенным введением в *v. porta* [5]. На 1-е, 2-е, 3-и, 5-е, 7-е, 14-е, 21-е и 28-е сутки у подопытных кроликов брали кровь для биохимических исследований. На протяжении всего срока

The possibility for the liver isolated cell transplantation has been studied for recent decades. It has been shown that in a recipient's organism if one uses the adequate immune suppression they are capable of surviving for a long time, accomplish hepatospecific functions and even cleave [11, 12]. The central role, which liver plays in the lipid metabolism and in the development of its disorders [2], can be considered as a sufficient reason for studying the possibility to correct the dyslipidemic states via the liver cell transplantation. The possibilities for the liver cell clinical application have been considerably extended with the development of methods of their low temperature preservation and storage, therefore the most expedient is to consider namely the usage of cryopreserved material in the experimental model.

The aim of this work was to study the effect of cryopreserved hepatocytes to the lipid metabolism at allotransplantation to the rabbits with experimental HC.

### Materials and methods

The experiments were carried-out in the 2-3.5 kg adult breedless male rabbits. In order to create the model of experimental HC the animals were maintained under the standard vivarium conditions and they were introduced with 0.5 g of CS per os per day.

Rabbits' hepatocytes were isolated using a non-enzymatic method [15], cryopreserved according to a three-stage freezing program under protection of 5% dimethyl sulfoxide [14] and stored under low temperature bank conditions at  $-196^{\circ}\text{C}$ . The viability of liver cells was determined by the resistance to the staining rate with trypane blue [17], the cell concentration was counted in Goryaev's chamber [7].

Five months after cholesterol diet the animals were divided into two groups ( $n=5$ ). The first group was intraportally introduced with 20 ml of the suspension, containing  $10^8$  of cryopreserved allogenic hepatocytes. The second group (the control) was pseudo-operated, where 20 ml of Hank's solution were injected into a portal vein. When selecting the doses of the transplanted cells we followed the data of the papers [10, 12, 18].

The transplantation of cell suspensions was performed by an intravenous injection into a *v. porta* [5]. To the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup>, 5<sup>th</sup>, 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, 21<sup>st</sup> and 28 days the blood was taken in rabbits for biochemical investigations. Within the whole term of post-operative observation (28 days) the animals have still had CS. The concentration of total CS, CS of lipoproteins of high density (LHD) and triacyl glycerides (TAG) were determined in blood serum by enzymatic methods using the sets of "Vektor-Best" and "Olvex" firms (Russia), as well as the TBA (thiobarbituric acid) active products [1].

The results were statistically processed with PC

послеоперационного наблюдения (28 сут) животные продолжали получать ХС.

Ферментативными методами с использованием наборов фирм “Вектор-Бест” и “Ольвекс” (Россия) в сыворотке крови определяли концентрацию общего ХС, ХС, липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) и триацилглицеридов (ТАГ), а также содержание ТБК (тиобарбитуровая кислота) активных продуктов [1].

Статистически результаты обрабатывали на персональном компьютере по специализированным программам. Для определения достоверности данных использовали непараметрический метод статистического анализа Манна-Уитни.

### Результаты и обсуждение

В послеоперационный период гибели животных отмечено не было. Вместе с тем в течение первой недели после хирургического вмешательства наблюдалось значительное снижение массы тела, подвижности и некоторое ухудшение качества шерстного покрова кроликов как экспериментальной, так и контрольной групп. В течение 2-3 суток после операции отмечался отказ от пищи. К 21-м суткам масса тела восстанавливалась, по внешнему виду и поведенческим реакциям состояние животных не отличалось от исходного.

Наблюдение за концентрацией в сыворотке крови подопытных кроликов общего ХС показало (рис. 1), что в контрольной группе животных в течение первой недели после операции отмечается значительное его повышение, причем особенно резко на 5-е и 7-е сутки. Далее происходит его медленное снижение до дооперационного уровня. В группе животных, которым трансплантировали криоконсервированные гепатоциты, концентрация общего ХС в течение 2-7 суток после трансплантации оставалась неизменной, а в контрольной группе наблюдалось ее резкое повышение. Далее динамика изменения показателя в экспериментальной и контрольной группах совпадала.

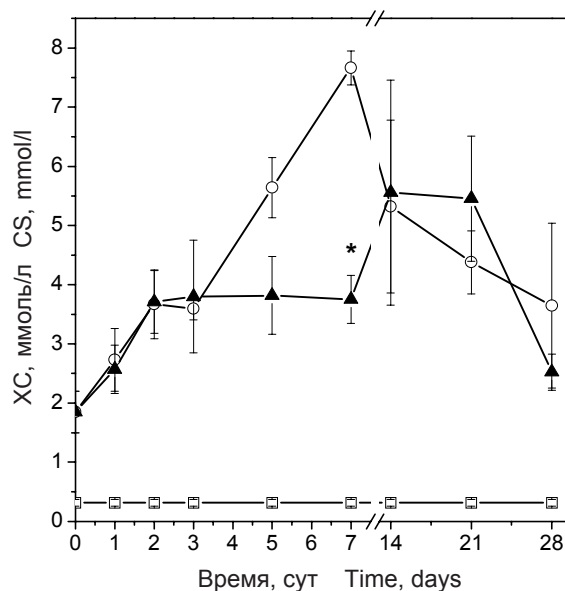
На рис. 2 представлена динамика изменения содержания ХС ЛПВП после трансплантации криоконсервированных гепатоцитов. В контрольной группе она практически повторяет картину изменения общего ХС. В группе, подвергшейся трансплантации аллогепатоцитов, в пределах недельного срока повышение концентрации ХС ЛПВП наблюдается только на 5-е сутки ( $p < 0,05$  по сравнению с исходным уровнем). В дальнейшем направленность изменений содержания ХС ЛПВП в сыворотке крови животных после трансплантации гепатоцитов практически совпадает с таковой для общего ХС. Достоверных отличий по сравнению с контролем на протяжении всего периода наблюдения не выявлено.

by special programs. The non-parametric method of statistical analysis: Mann-Whitney test was used for determining the data statistical truth.

### Results and discussion

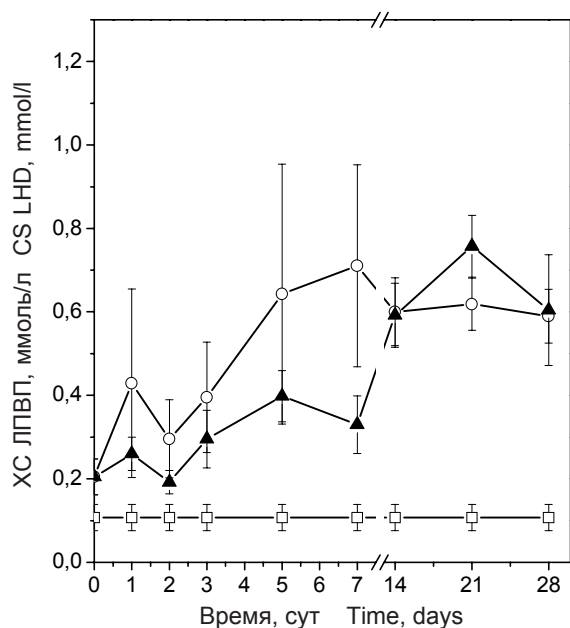
In a post-operative period no death in animals was observed. However, during the first week after surgical invasion there was observed a considerable decrease in body mass, mobility and a certain worsening of the hairy cover quality in rabbits of both experimental and control groups. During 2-3 days after operation there was noted a refusal of food. To the 21<sup>st</sup> day the body mass was recovered, by the appearance and behaviour reactions the state of animals did not differ from the initial one.

The observation for total CL concentration in blood serum of experimental rabbits demonstrated (Fig. 1), that in the control group of animals during the first week after operation there was noted its considerable increase, moreover especially sharp to the 5<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> days. Then its slow decrease down to a pre-operative level occurs. In the group of animals, to which the cryopreserved hepatocytes were transplanted, the total CS concentration during 2-7 days after transplantation remained without any change, but in the control group its sharp increase was observed. Further the dynamics of the index change in the experimental and control groups coincided. The Fig. 2 shows the dynamics of change in CL LHD after cryopreserved hepatocyte transplantation. In the control group it practically



**Рис.1.** Концентрация общего ХС в сыворотке крови кроликов с экспериментальной ГХ после аллотрансплантации криоконсервированных гепатоцитов: □ – норма; ○ – контроль; ▲ – криоконсервированные гепатоциты; \* –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

**Fig. 1.** Concentration of total CS in blood serum of rabbits with experimental HC after cryopreserved hepatocyte allotransplantation: □ – norm; ○ – control; ▲ – cryopreserved hepatocytes; \* -  $p < 0.05$  in comparison with the control.



**Рис. 2.** Концентрация ХС ЛПВП в сыворотке крови кроликов с экспериментальной ГХ после аллогенной трансплантации криоконсервированных гепатоцитов: □ – норма; ○ – контроль; ▲ – криоконсервированные гепатоциты.

**Fig. 2.** Concentration of CS LHD in blood serum of rabbits with experimental HC after cryopreserved hepatocyte allogenic transplantation: □ – norm; ○ – control; ▲ – cryopreserved hepatocytes.

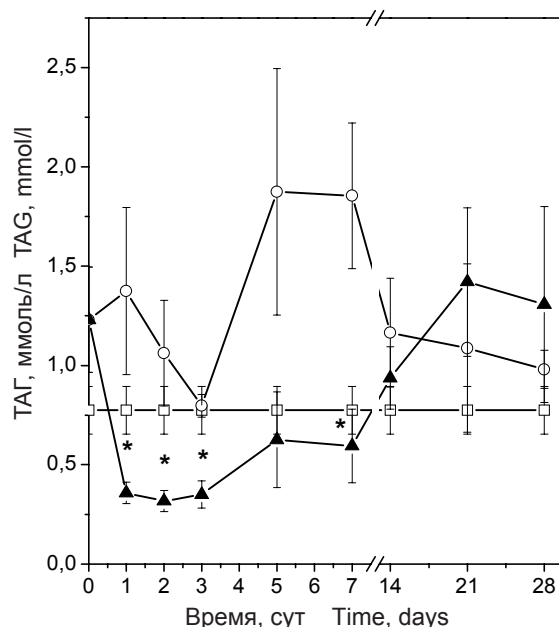
Изучение концентрации ТАГ в сыворотке крови показало значительное снижение данного параметра на протяжении первой недели в группе животных, подвергнутых трансплантации криоконсервированных гепатоцитов. При этом в контрольной группе животных значения данного показателя хотя и претерпевали некоторые колебания, но достоверных отличий от дооперационного уровня все же не наблюдалось (рис.3). На 14-28-е сутки после введения клеток печени содержание в сыворотке ТАГ повышалось и достоверно не отличалось ни от исходного, ни от значений в контрольной группе.

Изучение интенсивности процессов ПОЛ, оцененное по содержанию в сыворотке крови ТБК активных продуктов, показало (рис.4), что в ответ на оперативное вмешательство в контрольной группе кроликов наблюдается значительное его увеличение с пиком на 3-и сутки ( $p < 0,01$ ), после чего отмечается постепенное снижение до дооперационного уровня на 28-й день. Достоверное повышение значения данного показателя по сравнению с контролем в группе, которой трансплантировали криоконсервированные гепатоциты, наблюдается только на 14-е сутки. Введение криоконсервированных гепатоцитов приводит к увеличению концентрации малонового альдегида (МДА) в сыворотке крови уже на первые сутки после трансплантации ( $p < 0,01$ ). Достаточно

repeats the image of change in total CS. In the group, subjected to the allohepatocyte transplantation, within a week term, an increase in CS LHD concentration is noted only to the 5<sup>th</sup> day ( $p < 0.05$  in comparison with the initial level). Further the orientation of changes in CS LHD content in blood serum of animals after hepatocyte transplantation practically coincides with that for total CS. During the whole observation period no statistical and true differences in comparison with the control were found.

The study of TAG concentration in blood serum demonstrated a considerable reduction of this parameter during all the first week in the group of animals, subjected to the transplantation of cryopreserved hepatocytes. At the same time in the control group of animals the values of this index although underwent some alterations, but nevertheless no statistical and true differences from a pre-operative level were observed (Fig. 3). To the 14<sup>th</sup>-28<sup>th</sup> days after introducing liver cells the TAG content in serum increased and did not statistically and truly differ either from the initial one, or from the values in the control group.

The study of the intensity of LPO process, estimated by the TBA-active products content in blood serum, demonstrated (Fig. 4), that in response to an operative invasion in the control group of rabbits there was observed its considerable increase with the peak to the 3<sup>rd</sup> day ( $p < 0.01$ ), afterwards a gradual decrease down to a preoperative level to the 28<sup>th</sup> day was noted.



**Рис.3.** Концентрация ТАГ в сыворотке крови кроликов с экспериментальной ГХ после аллотрансплантации криоконсервированных гепатоцитов: □ – норма; ○ – контроль; ▲ – криоконсервированные гепатоциты. \* –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

**Fig. 3.** Concentration of TAG in blood serum of rabbits with experimental HC after cryopreserved hepatocyte allotransplantation: □ – norm; ○ – control; ▲ – cryopreserved hepatocytes; \* –  $p < 0.05$  in comparison with the control.

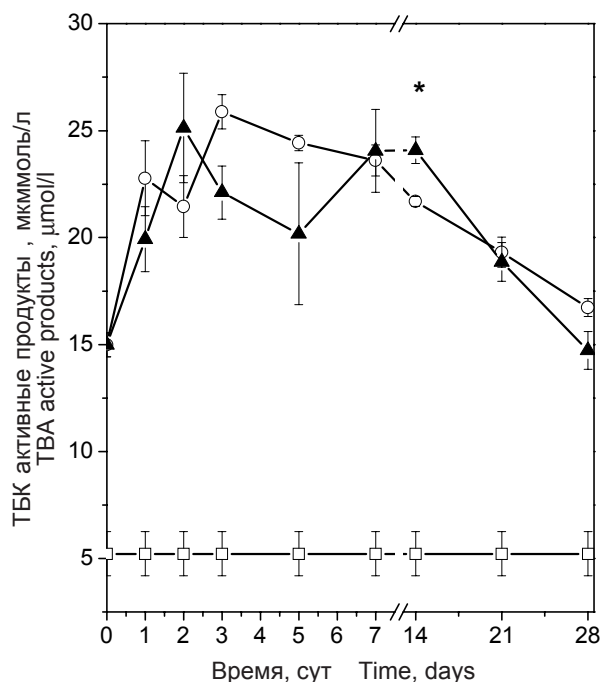
высокий уровень исследуемого параметра сохраняется до 14-х суток включительно. На 21-28-е сутки происходит постепенное снижение концентрации МДА, в конечном итоге достигая исходного уровня.

Нами установлено, что в течение первой недели после операции в сыворотке крови животных контрольной группы происходит значительное повышение концентрации общего ХС, ХС ЛПВП и ТБК активных продуктов, при этом содержание ТАГ остается неизменным. Трансплантация криоконсервированных гепатоцитов препятствует резкому повышению как общего ХС, так и ХС ЛПВП (исключая 5-е сутки после трансплантации), однако при этом в сыворотке крови наблюдаются значительное повышение уровня ТБК активных продуктов и резкое снижение концентрации ТАГ. В более поздние сроки достоверных отличий между экспериментальной и контрольной группами практически не выявлено, все исследуемые показатели плавно возвращаются к дооперационным значениям.

Резкое повышение концентрации общего ХС, происходящее в контрольной группе в течение первой недели после хирургической операции (см. рис. 1), явилось фактом неожиданным. Наиболее богаты ХС ЛПНП, поэтому можно предположить, что наблюдаемый эффект происходит именно за счет повышения концентрации ЛПНП. Поскольку концентрация ХС, входящего в состав ЛПВП, известна (см. рис. 2), то можно утверждать, что повышение концентрации общего ХС в течение первой недели после ложной операции происходит не за счет роста уровня ЛПВП. Отсутствие в контрольной группе пропорционального возрастания концентрации ТАГ исключает ведущую роль липопротеинов очень низкой плотности в увеличении общего ХС, поскольку эта фракция на 50-70% состоит именно из ТАГ. Исходя из этого, можно говорить о том, что хирургическое вмешательство на фоне экспериментальной ГХ (без трансплантации клеток) приводит к повышению концентрации двух фракций липопротеинов: ЛПНП и ЛПВП. Следует отметить, что в гепатоцитах утилизируется основная часть обеих фракций липопротеинов [15].

Можно предположить, что хирургическая операция, являясь сильным стрессом, приводит к нарушению способности печени утилизировать липопротеины крови. Этот эффект, очевидно, связан с тем, что клетки паренхимы печени животных с экспериментальной ГХ имеют значительные нарушения метаболизма [4].

Хирургическое вмешательство неизбежно приводит к тканевым повреждениям, следствием чего является развитие воспалительной реакции.



**Рис.4.** Концентрация ТБК-активных продуктов в сыворотке крови кроликов с экспериментальной ГХ после аллотрансплантации криоконсервированных гепатоцитов: □ – норма; ○ – контроль; ▲ – криоконсервированные гепатоциты; \* –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

**Fig. 4.** Concentration of TBA-active products in blood serum of rabbits with experimental HC after cryopreserved hepatocyte allotransplantation: □ – norm; ○ – control; ▲ – cryopreserved hepatocytes; \* –  $p < 0.05$  in comparison with the control.

Statistical and true increase in this index value in comparison with the control in the group, which the cryopreserved hepatocytes were transplanted to, was observed only to the 14<sup>th</sup> day. The introduction of cryopreserved hepatocytes results in the augmentation of malone dialdehyde (MDA) concentration in blood serum even to the first 24 hrs after transplantation ( $p < 0.01$ ). Up to the 14<sup>th</sup> day including a quite high level of the studied parameter is kept. To the 21<sup>st</sup>-28<sup>th</sup> day a gradual decrease in MDA concentration occurs, finally achieving the initial level.

We found, that during the first week after operation in blood serum of the control animal group a considerable increase in the concentration of total CS, CS LHD and TBA active products occurs, at the same time the TAG content remains without any change. The transplantation of cryopreserved hepatocytes impedes a sharp increase in both total CS and CS LHD (excluding the 5<sup>th</sup> day after transplantation), however in this case a considerable augmentation of the TBA active product level and a sharp reduction of TAG concentration are observed in blood serum. No statistical and considerable differences between experimental and control groups were practically

С одной стороны, это может усиливать повреждение измененной при формировании модели ГХ печеночной паренхимы, а с другой - при участии медиаторов воспаления функции гепатоцитов могут переключаться на синтез белков острой фазы [6].

Кроме того, трансплантированные гепатоциты не могут функционировать полноценно, пока не попадут в физиологичное микроокружение. Полная интеграция донорских гепатоцитов в печеночную паренхиму реципиента с формированием нормальных межклеточных контактов занимает не менее 3-х суток [11].

Известно также, что используемые нами криоконсервированные клетки не могут немедленно выполнять гепатоспецифические функции. Для реабилитации клеток после низкотемпературного консервирования и восстановления их нормального метаболизма необходимо некоторое время [9]. Вероятно, вышеперечисленные причины и определяют отсутствие эффектов от введения трансплантированных клеток в первые 3-е суток после трансплантации.

Тот факт, что на 5-7-е сутки после трансплантации концентрация общего ХС в опытной группе ниже, чем в контрольной, вероятнее всего, связан с функционированием трансплантированных клеток, которые либо непосредственно осуществляют захват ЛПНП, либо оказывают стимулирующее и регулирующее действие на печеночную паренхиму реципиента. Следует отметить, что в этот период происходит и снижение коэффициента атерогенности, характеризующего степень риска развития атеросклероза.

Согласно данным [3], при развитии модели экспериментальной ГХ в микросомах печени кроликов возрастает скорость ферментативного генерирования липопероксидов, что изменяет активность мембраносвязанных ферментов [3], подавляет активность ключевого фермента катаболизма ХС –  $7\alpha$ -холестерингидроксилазы [4]. Это приводит к усилению жирового перерождения печени и к значительным нарушениям клеточного метаболизма. При этом не происходит нарушений в секреции липопротеинов, в связи с чем в кровь животных могут поступать окисленные липопротеины. Перекисно-модифицированные липопротеины, в первую очередь ЛПНП, быстро теряют сродство к рецепторам, ответственным за их нормальное удаление из кровотока в связи со структурными и конформационными изменениями аполипопротеинов, входящих в их состав. Тем не менее они быстро удаляются из кровотока клетками ретикуло-эндотелиальной системы, оказываясь вовлеченными в происходящий в интиме сосудов каскад реакций, приводящих к

revealed in later terms, all the studied indices smoothly revert to the preoperative values.

A sharp increase in the total CS concentration, occurring in the control group during the first week after surgical operation (see Fig. 1) was unexpected. The LLD are the richest with cholesterol, therefore we can suppose, that the observed effect occurs due to an increase in LLD concentration. Since the concentration of CS, being a part of LHD, is known (see Fig. 2), we can state, that an increase in the total CS concentration during the first week after pseudo-operation occurs not due to the LHD level growth. The absence in the control group of a proportional increase in the TAG concentration excludes the leading role of lipoproteins with a very low density in the augmentation of total CS, because this fraction for 50-70% consists namely of TAG. Proceeding from this, we can speak about the fact, that surgical invasion at the background of experimental HC (without cell transplantation) results in an increase of the concentration of two lipoprotein fractions: LLD and LHD. It should be noted, that the main part of both lipoprotein fractions is utilised in hepatocytes [15].

We can suppose that surgical operation, being a strong stress, results in the disorders of liver capability to utilise blood lipoproteins. This effect is evidently related to the fact, that the liver parenchyma cells of animals with experimental HC have considerable metabolism disorders [4].

Surgical invasion inevitably leads to the tissue damages, resulting in the development of inflammatory reactions. On the one hand, this can strength the damages of changed liver parenchyma during HC model formation, on the other hand, when the inflammation mediators take part, the hepatocyte functions can be shifted towards the synthesis of acute phase proteins [6].

In addition, the transplanted hepatocytes can not integrally function until they get into a physiological microenvironment. A complete integration of donor hepatocytes into a recipient's liver parenchyma with formation of normal intercellular contacts takes not less than 3 days [11].

It is also known, that the used by us cryopreserved cells can not immediately accomplish the hepatospecific functions. Some time is necessary for cell rehabilitation after low temperature preservation and for recovering their normal metabolism [9]. Probably, the mentioned above reasons determine the absence of the effect from the transplanted cell introduction during the first 3 days after transplantation.

The fact, that to the 5<sup>th</sup>-7<sup>th</sup> day after transplantation the total CS concentration in the experimental group is lower, than in the control group is probably related to the functioning of transplanted cells, which either directly accomplish the LLD capture, or cause a

развитию атеросклероза.

Параллельное повышение концентрации общего ХС и ТБК-активных продуктов объясняется тем, что основная часть ХС сыворотки крови сосредоточена в ЛПНП, а этот класс липопротеинов очень беден антиоксидантами и легко подвергается процессам перекисного окисления. Также возможен выброс окисленных ЛПНП непосредственно печенью.

Результаты, полученные ранее в системе *in vitro* [8] и представленные в работе в системе *in vivo*, свидетельствуют о способности изолированных гепатоцитов снижать содержание ХС в гиперхолестеринемической сыворотке крови. При трансплантации исследуемого материала в печень реципиентов с экспериментальной ГХ отмечаемые эффекты ограничиваются первой неделей наблюдения, вероятно, вследствие прекращения функционирования трансплантата.

### Выводы

Таким образом, представленные экспериментальные данные позволяют оценивать криоконсервированные изолированные гепатоциты как биологический объект, способный оказывать значительное регулирующее действие на липидный обмен при экспериментальной ГХ.

### Литература

1. Андреева Л.Н. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // Лаб. дело.– 1988.– №11.– С. 41-43.
2. Климов А.Н., Никольцева Н.Г. Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения.– СПб, 1999.– 512 с.
3. Ланкин В.З. Биохимия липидов и их роль в обмене веществ.– М., 1981.– С. 75-95.
4. Ланкин В.З., Вихерт А.М. Перекисное окисление липидов в этиологии и патогенезе атеросклероза// Архив патологии.– 1989.– Т.51, №1.– С. 80-85.
5. Лебединский А.С., Петренко А.Ю. Особенности выделения, криоконсервирования и аллогенной трансплантации гепатоцитов кроликов // Пробл. криобиологии.– 2003.– №1.– С. 51-58.
6. Назорнев В. А., Назаров П. Г., Полевщиков В. А. и др. Атерогенез и реакция "острой фазы" печени // Архив патологии.– 1998.– №6.– С. 62-68.
7. Неменова Ю.М. Методы лабораторных клинических исследований.– М., 1972.– 424 с.
8. Сукач А.Н., Лебединский А.С. Влияние изолированных гепатоцитов на концентрацию атерогенных липопротеинов в сыворотке крови человека // Биол. вестник.– 1999.– Т.3, №1-2.– С. 33-35.
9. Borel Rinkes I.H., Toner M., Sheeha S.J., et al. Long-term functional recovery of hepatocytes after cryopreservation in a three-dimensional culture configuration // Cell Transplant.– 1992.– Vol.1, N4.– P. 281-292.
10. Eguchi S., Rozga J., Lebow L.T. et al. Treatment of hypercholesterolemia in the Watanabe rabbit using allogeneic hepatocellular transplantation under a regeneration stimulus // Transplantation.– 1996.– Vol.15, N62(5).– P. 588-593.

stimulating and regulating effect on a recipient's hepatic parenchyma. It should be noted as well, that during this period a decrease in the atherogeneity coefficient occurs, characterising the risk degree of atherosclerosis development.

According to the data [3], at the development of the model of experimental HC in rabbit's liver microsomes, there is an increase in the rate of enzymatic generating of lipoperoxides, that changes the activity of membrane-bound enzymes [3], suppresses the activity of key enzyme of CS-7 $\alpha$ -cholesterol hydroxidase catabolism [4]. This results in strengthening the liver fat degeneration and in the considerable disorders of cellular metabolism. At the same time no impairments in lipoprotein secretion occur, due to this the oxidised lipoproteins can enter into the animals' blood. Peroxide-modified lipoproteins, first of all, LLD, lose quickly the affinity to the receptors, responsible for their normal removal from blood flow, due to the structural and conformational changes of apolipoproteins, being their part. However, they are quickly removed from blood flow by cells of reticuloendothelial system, being involved in the proceeding reaction cascade in the vessel intima, leading to the atherosclerosis development.

The parallel increase in the total CS and TBA active products concentration is explained by the fact, that the main CS part of blood serum is concentrated in LLD, and this class of lipoproteins is very poor of antioxidants and is easily subjected to the lipid peroxidation processes. The release of oxidised LLD by liver itself is possible as well.

The recent results, obtained by us in the *in vitro* system [8] and presented in this work in the *in vivo* system testify to the capability of isolated hepatocytes to reduce the CS content in hypercholesterolemic blood serum.

When transplanting the studied material into recipients' liver with the experimental HC, the noted effects are limited with the first observation week, probably due to the transplant functioning ceasing.

### Conclusions

Thus, the presented experimental data allow to estimate the cryopreserved isolated hepatocytes as a biological object, able to cause the considerable regulating effect on lipid metabolism under experimental HC.

### References

1. Андреева Л.Н. Modification of the method for determining lipid peroxides in the test with thiobarbituric acid // Lab. Delo.– 1988.– N11.– P. 41-43.
2. Klimov A.N., Nikulcheva N.G. Lipid and lipoprotein metabolism and its impairments.– Saint-Petersburg, 1999.– 512p.

11. *Guha C., Parashar Bh., Deb N. J. et al.* Normal hepatocytes correct serum bilirubin after repopulation of Gunn rat liver subjected to irradiation/partial resection // *Hepatology.*– 2002.– P. 354-362.
12. *Gunsalus J.R., Brady D.A., Coulter S.M. et al.* Reduction of serum cholesterol in Watanabe rabbits by xenogeneic hepatocellular transplantation // *Nat Med.* – 1997. – Vol.3, N1.– P. 48-53.
13. *Gupta S, Rajvanshi P, Sokhi R, et al.* Entry and integration of transplanted hepatocytes in rat liver plates occur by disruption of hepatic sinusoidal endothelium // *Hepatology.*– 1999.– Vol.29, N2.– P. 509-519.
14. *Petrenko A.Yu., Sukach A.N.* Isolation of intact mitochondria and hepatocytes using vibration // *Analytical Biochem.*– 1991.– Vol.194, N2.– P. 326-329
15. *Petrenko A.Yu., Sukach A.N., Grischuk V.P. et al.* Separation of intact and damaged hepatocytes in sucrose following non-enzymatic liver perfusion // *Cytotechnology.*– 1995.– Vol.17.– P. 127-131.
16. *Pittman R.C., Steinberg D.* Sites and mechanisms of uptake and degradation of high density and low density lipoprotein // *J. Lipid Res.*– 1984.– Vol.25.– P. 67-72.
17. *Seglen P.O.* Preparation of isolated rat liver cells // *Meth. Cell Biol.*– 1976.– Vol.13. – P. 29-83.
18. *Wiederkehr J.C., Kondos G.T., Pollak R.* Hepatocyte transplantation for the low-density lipoprotein receptor-deficient state. A study in the Watanabe rabbit // *Transplantation.*– 1990.– Vol.50, N3.– P. 466-471.
3. *Lankin V.Z.* Lipid biochemistry and their role in metabolism.– Moscow, 1981.– P. 75-95.
4. *Lankin V.Z., Vikhert A.M.* Lipid peroxidation in etiology and pathogenesis of atherosclerosis // *Arkh. patol.*– 1989.– Vol.51, N1.– P. 80-85.
5. *Lebedinsky A.S., Petrenko A.Yu.* Peculiarities of isolation, cryopreservation and allogenic transplantation of rabbit's hepatocytes // *Problems of Cryobiology.*– 2003.– N1.– P.51-58.
6. *Nagornev V.A., Nazarov P.G., Polevshikov V.A. et al.* Atherogenesis and reaction of the liver "acute phase" // *Arkh. patol.*– 1998.– N6.– P.62-68.
7. *Nemenova Yu.M.* Methods of laboratory clinical investigations.– Moscow, 1972.– 424 p.
8. *Sukach A.N., Lebedinsky A.S.* Effect of isolated hepatocytes on the concentration of atherogenic lipoproteins in human blood serum // *Biologicheskii vestnik.*– 1999.– Vol.3, N1-2.– P.33-35.
9. *Borel Rinkes I.H., Toner M., Sheeha S.J., et al.* Long-term functional recovery of hepatocytes after cryopreservation in a three-dimensional culture configuration // *Cell Transplant.*– 1992.– Vol.1, N4.– P. 281-292.
10. *Eguchi S., Rozga J., Lebow L.T. et al.* Treatment of hypercholesterolemia in the Watanabe rabbit using allogeneic hepatocellular transplantation under a regeneration stimulus // *Transplantation.*– 1996.– Vol.15, N62(5).– P. 588-593.
11. *Guha C., Parashar Bh., Deb N. J. et al.* Normal hepatocytes correct serum bilirubin after repopulation of Gunn rat liver subjected to irradiation/partial resection // *Hepatology.*– 2002.– P. 354-362.
12. *Gunsalus J.R., Brady D.A., Coulter S.M. et al.* Reduction of serum cholesterol in Watanabe rabbits by xenogeneic hepatocellular transplantation // *Nat Med.* – 1997. – Vol.3, N1.– P. 48-53.
13. *Gupta S, Rajvanshi P, Sokhi R, et al.* Entry and integration of transplanted hepatocytes in rat liver plates occur by disruption of hepatic sinusoidal endothelium // *Hepatology.*– 1999.– Vol.29, N2.– P. 509-519.
14. *Petrenko A.Yu., Sukach A.N.* Isolation of intact mitochondria and hepatocytes using vibration // *Analytical Biochem.*– 1991.– Vol.194, N2.– P. 326-329
15. *Petrenko A.Yu., Sukach A.N., Grischuk V.P. et al.* Separation of intact and damaged hepatocytes in sucrose following non-enzymatic liver perfusion // *Cytotechnology.*– 1995.– Vol.17.– P. 127-131.
16. *Pittman R.C., Steinberg D.* Sites and mechanisms of uptake and degradation of high density and low density lipoprotein // *J. Lipid Res.*– 1984.– Vol.25.– P. 67-72.
17. *Seglen P.O.* Preparation of isolated rat liver cells // *Meth. Cell Biol.*– 1976.– Vol.13. – P. 29-83.
18. *Wiederkehr J.C., Kondos G.T., Pollak R.* Hepatocyte transplantation for the low-density lipoprotein receptor-deficient state. A study in the Watanabe rabbit // *Transplantation.*– 1990.– Vol.50, N3.– P. 466-471.

*Поступила 9.09.2003*

*Accepted in 9.09.2003*