

Влияние криоконсервированных клеток фетальной печени на выживаемость, состояние прооксидантно-антиоксидантной и монооксигеназной систем крыс при старении

UDC 616-089.843:615.36136.013.014.41

O.V. OCHENASHKO^{1*}, Yu.V. NIKITCHENKO², A.A. SHEREMET², A.YU. PETRENKO¹

Effect of Fetal Liver Cryopreserved Cells on Survival, State of Prooxidant-Antioxidant and Monoxygenase Systems of Rats During Ageing

В работе изучено влияние длительного введения криоконсервированных клеток фетальной печени (КФП) на динамику ряда показателей прооксидантно-антиоксидантной системы крови, состояние монооксигеназной системы печени и выживаемость крыс при старении. Установлено, что многократные инъекции КФП стареющим крысам увеличивают их выживаемость, снижают уровень продуктов ПОЛ и повышают надежность антиоксидантной и монооксигеназной систем. Эти данные позволяют рассматривать КФП как перспективный способ коррекции возрастных изменений.

Ключевые слова: криоконсервированные клетки фетальной печени, крысы, старение, монооксигеназная система печени, прооксидантно-антиоксидантная система, выживаемость.

У роботі досліджено вплив довготривалого введення криоконсервованих клітин фетальної печінки (КФП) на динаміку ряду показників прооксидантно-антиоксидантної системи крові, стан монооксигеназної системи печінки і виживаність щурів при старінні. Встановлено, що багатократні ін'єкції КФП старіючим щурам збільшують їх виживаність, знижують рівень продуктів ПОЛ та підвищують надійність антиоксидантної і монооксигеназної систем. Отримані дані дозволяють розглядати КФП як перспективний засіб корекції вікових змін.

Ключові слова: криоконсервовані клітини фетальної печінки, щури, старіння, монооксигеназна система печінки, прооксидантно-антиоксидантна система, виживаність.

The effect of a long-term introduction of cryopreserved fetal liver cells (FLCs) on dynamics of some indices of blood prooxidant-antioxidant system, state of liver monoxygenase system and survival of rats during ageing, has been studied in the research. Multiple injections of FLCs to rats under ageing were established to increase their survival rate, to decrease the level of LPO products and augment the reliability of prooxidant and monoxygenase systems. These data enable considering the FLCs as a perspective way to correct the age-related changes.

Key-words: cryopreserved fetal liver cells, rats, ageing, monoxygenase system of liver, prooxidant-antioxidant system, survival.

Поиск новых подходов и средств для увеличения продолжительности жизни является одной из актуальных биомедицинских проблем современности. Выраженное биологическое действие трансплантации криоконсервированных клеток фетальной печени (КФП), направленное на восстановление структурной и функциональной целостности клеток и организма в целом [5, 8], позволяет рассматривать КФП как перспективное геропротекторное средство.

Вместе с тем влияние трансплантации криоконсервированных КФП на выживаемость, свободно-радикальные процессы и процессы детоксикации стареющего организма практически не изучено.

Цель работы – изучить влияние длительного введения КФП на динамику ряда показателей

прооксидантно-антиоксидантной системы крови, состояние монооксигеназной системы печени и выживаемость крыс при старении.

Материалы и методы

Исследования проведены на белых нелинейных крысах-самцах, содержащихся в соответствии с положениями “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей” (Страсбург, 1986). Все хирургические манипуляции, включая декаптацию, проводили под эфирным наркозом.

Клетки фетальной печени выделяли из эмбрионов человека неферментативным методом [8] и криоконсервировали под защитой 10% ДМСО с использованием программного замораживателя.

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

²Институт биологии Харьковского национального университета им. В.Н. Каразина, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Перейславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.:+38 (057) 373-31-26, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

²Institute of Biology of the V.N. Karazin Kharkov National University, Kharkov, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373 3126, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Перед опытом КФП отогревали и вводили в бедренную вену крыс с 13-месячного возраста (10 млн клеток/0,3 мл) 4 раза с интервалом 3 мес. Жизнеспособность КФП была не менее 60% (тест с окрашиванием трипановым синим). Контрольной группе животных вводили среду криоконсервирования клеток в эквивалентном объеме.

Перед каждым введением клеток (13-, 16-, 19- и 22-месячным крысам), а также в конце эксперимента у 25-месячных животных в сыворотке крови, полученной из хвостовой вены, измеряли содержание гидроперекисей липидов (ГПЛ) [3], супероксиддисмутазную и глутатионпероксидазную активности [4, 9]. Содержание цитохрома P-450 [6] и амидопирин-N-деметилазную активность [7] определяли в гомогенате печени 25-месячных животных после их декапитации. Все измерения проводили на двухлучевом спектрофотометре Spscord UV VIS (Германия, Йена) при 37°C.

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

Для оценки достоверности различий использовали t-критерий Стьюдента. Расчет выживаемости проводили по методу Каплана-Мейера [1]. Для сравнения кривых выживаемости использовали критерий Гехана с поправкой Йейтса [1].

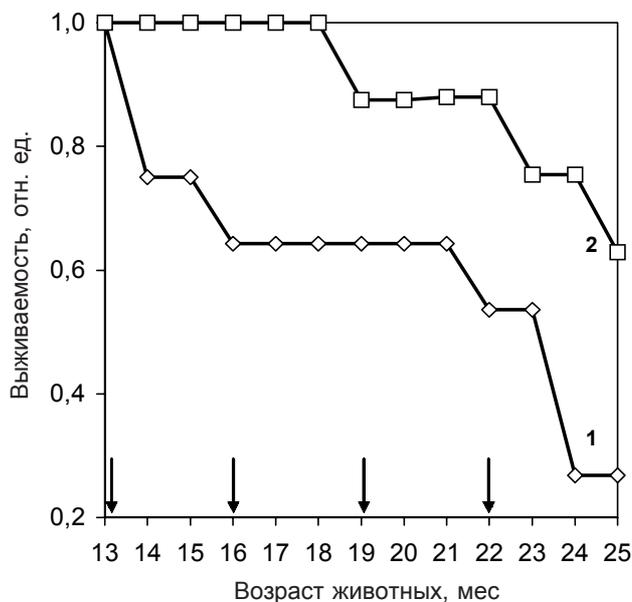
Результаты и обсуждение

Проведенные в течение 12 мес (возраст крыс с 13 по 25 месяцев) исследования позволили установить, что к концу эксперимента численность контрольных крыс сокращалась на 60%, а опытных – только на 40%. Из данных, представленных на рисунке, видно, что кривая выживаемости животных, длительное время получавших КФП, при всех исследуемых сроках эксперимента была существенно выше кривой выживаемости контрольных крыс. Сравнение кривых выживаемости (по Гехану с поправкой Йейтса) показало их достоверное отличие.

Амидопирин-N-деметилазная активность и содержание цитохрома P-450 в гомогенатах печени старых крыс (25 мес) в контроле и после многократного введения клеток фетальной печени

Исследуемые параметры	Контроль	Введение КФП
Амидопирин – N – демети – лазная активность, пмоль/мин·мг белка	347,5±60,1	587,8±80,9*
Содержание цитохрома P – 450, пмоль/мг белка	50,2±12,5	94±10,2*

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем.



Кривые выживаемости (по Каплан-Мейеру) крыс, которым с 13-месячного возраста повторно вводили среду 1, (контроль) и криоконсервированные клетки фетальной печени 2 (опыт); ↓ – интервалы внутривенных инъекций.

Исследование динамики содержания ГПЛ в крови крыс в возрасте от 13 до 25 мес позволило установить, что концентрация этих продуктов ПОЛ у контрольных животных увеличивалась к 25-месячному возрасту на 24% ($p < 0,05$), а у крыс, длительное время получавших КФП, достоверно не изменялась.

Активность глутатионпероксидазы – основного фермента, утилизирующего ГПЛ крови, у контрольных крыс несколько увеличивалась к 19-месячному возрасту, а затем к 25-месячному значительно снижалась (на 44%) по сравнению с 13-месячными животными. У животных, которым вводили КФП, активность исследуемого фермента достоверно не изменялась.

Супероксиддисмутазная активность сыворотки крови крыс контрольной группы монотонно снижалась в течение всего срока наблюдения, и у 25-месячных животных была на 30% ниже ($p < 0,05$), чем у 13-месячных крыс. У животных, которым вводили КФП, активность фермента достоверно не изменялась.

Изученные показатели, характеризующие состояние монооксигеназной системы печени – содержание цитохрома P-450 и амидопирин-N-деметилазная активность, которые согласно данным [2] снижались при старении крыс, после многократных инъекций КФП были значительно выше уровня контрольных животных (таблица). Так, амидопирин-N-деметилазная активность подопытных крыс превышала уровень контрольных в 1,7 раза, а содержание цитохрома P-450 – в 1,9 раза.

Выводы

Полученные данные свидетельствуют, что многократные инъекции криоконсервированных КФП стареющим крысам увеличивают их выживаемость, снижают уровень продуктов ПОЛ и повышают надежность антиоксидантной и монооксигенной систем. Эти данные позволяют рассматривать КФП как перспективный способ коррекции возрастных изменений и требуют проведения дальнейших детальных исследований механизмов их геропротекторного действия.

Литература

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика: Пер. с англ. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
2. Лемешко В.В. Система микросомального окисления при развитии и старении организма // Биохимия. – 1980. – Т. 45, №11. – С. 1964–1969.
3. Asakawa T., Matsushita S. Coloring condition of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxide // Lipids. – 1980. – Vol. 15, N3. – P.137–140.
4. Beauchamp C., Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // Anal. Biochem. – 1971. – Vol. 44, N1. – P. 276–287.
5. Lebedinsky A.S., Cherkashina D.V., Sukach A.N. et al. Positive effects of cryopreserved adult or fetal liver cell transplants on hypercholesterolemia and hepatic antioxidant defenses in cholesterol-fed rabbits // Cryobiology. – 2007. – Vol. 55, N1. – P. 72–79.
6. Matsubara T., Koike M., Touchi A. et al. Quantitative determination of cytochrome P-450 in rat liver homogenate // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 75, N2. – P. 596–603.
7. Nash T. Colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hartzsch reaction // Biochem J. – 1953. – Vol. 55, N 3. – P. 416–421.
8. Ochenashko O.V., Volkova N. A., Mazur S. P. et al. Cryopreserved fetal liver cell transplants support the chronic failing liver in rats with CCl₄-induced cirrhosis // Cell Transplant. – 2006. – Vol. 15, N1. – P. 23–33.
9. Paglia D.E., Valentine W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase // J. Lab. Clin. Med. – 1967. – Vol. 70, N1. – P. 158–169.

Поступила 08.07.2008