

Влияние внутривенного введения криоконсервированных эмбриональных клеток на прооксидантно-антиоксидантное состояние печени крыс при алкогольном поражении

Г.А. КОВАЛЁВ, Д.В. ЧЕРКАШИНА, В.В. РЯЗАНЦЕВ, А.Ю. ПЕТРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Хроническое употребление спиртных напитков широко распространено в современном обществе [6, 3]. Этанол – прямой гепатотоксичный агент [14, 11], который является одним из ведущих среди многообразия этиологических факторов поражения печени [2, 4]. Важным механизмом деструктивного действия этанола и его метаболита-ацетальдегида на печень является индукция оксидативного стресса [15]. Ранее нами было показано повышение интенсивности перекисных процессов в печени самок крыс под действием алкоголя, которое сопровождается снижением активности основных ферментов системы антиоксидантной защиты – каталазы и глутатионпероксидазы [8]. Наиболее богатым источником регионарных стволовых клеток являются эмбриональные органы и ткани. В связи с перспективой терапевтического применения стволовых клеток, актуальной задачей является изучение механизмов их действия на различных экспериментальных моделях [10], в том числе и на моделях патологии печени. Наши предыдущие исследования продемонстрировали способность эмбриональных клеток мозга (ЭКМ) улучшать функциональное состояние печени при хроническом отравлении алкоголем [12]. Имеются данные о положительном влиянии эмбриональных клеток печени (ЭКП) на прооксидантно-антиоксидантное состояние при отравлении тетра-хлорметаном [13], однако механизм действия эмбриональных клеток всё ещё изучен недостаточно.

Таким образом, целью настоящей работы было изучение влияния внутривенного введения криоконсервированных ЭКП и ЭКМ на прооксидантно-антиоксидантный баланс печени крыс при алкогольном поражении. Кроме того, в работе была предпринята попытка выявить введенные клетки в тканях животных методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Материалы и методы

Исследования выполнялись на 3-х месячных самках белых беспородных крыс массой 150-200 г (n=42). Эксперименты проводили в соответствии с «Общими принципами экспериментов на живот-

ных», одобренными I Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, Украина, 2001) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, Франция, 1985). Моделирование алкогольного поражения печени (АПП) проводили, как описано нами ранее [7]. Вкратце, модель включает в себя три этапа: 1 – отбор животных, склонных к алкоголизации; 2 – привыкание животных к алкоголю (2 недели); 3 – интенсивная алкоголизация (11 недель). В это время вместо обычной диеты крысы получали 96% раствор этанола на стандартных кусочках белого хлеба, два раза в неделю – побеги овса. Потребляемая каждым животным доза алкоголя составляла 14-18 г/кг массы тела в сутки. После развития АПП животных переводили на малую дозу алкоголя (15%-й раствор этанола – как единственный источник жидкости).

Эмбрионы человека 9-12 недель гестации были получены в результате планового прерывания беременности после письменного разрешения донора. Все эмбриональные клетки выделяли неферментативным методом и криоконсервировали по трёхэтапной программе замораживания.

Были сформированы следующие группы (n=6): 1 – интактные животные; 2 – крысы после формирования АПП; 3 – внутривенное введение среды криоконсервирования (СКК), 0,3 мл/100 г массы тела; 4,5 – введение криоконсервированных ЭКП или ЭКМ соответственно (10⁷ клеток/0,3мл СКК на 100 г массы тела).

Спустя 14 суток после введения эмбриональных клеток животных декапитировали, печень перфузировали *in situ* физиологическим раствором и готовили 25%-ный гомогенат на 50 мМ трис-НСl буфере, содержащем 50 мМ NaCl (pH 7,4). В гомогенатах печени исследовали базальный уровень ТБК-активных продуктов согласно методу [1], показатель выражали в пмоль МДА/мг белка. Также изучали интенсивность индуцированного перекисного окисления липидов (ПОЛ), для чего гомогенат инкубировали 10 минут в среде (pH 7,4), содержащей 50 мМ трис-НСl, 50 мМ NaCl, 0,25 мМ аскорбата и 12 μМ FeSO₄; выражали в пмоль МДА/мг белка за 1 мин [5]. Активность каталазы

Адрес для корреспонденции: Ковалёв Г.А., 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

исследовали по убыли перекиси водорода при длине волны 240нм [9], выражали в мкмоль H_2O_2 /мг белка за 1 мин. Активность глутатионпероксидазы определяли по убыли содержания восстановленного глутатиона, выражали в мкмоль GSSG/мг белка за 1 мин [16]. Содержание белка в гомогенате печени оценивали при помощи биуретового метода. Все измерения интенсивности поглощения проб проводили на спектрофотометре "Сару-50".

Детекцию цитомегаловируса (ЦМВ) и гена SRY, который всегда находится в у-хромосоме, проводили методом ПЦР. Тест-системы были получены из Института биологии гена РАН и имели детекцию продуктов ПЦР с помощью гелелектрофореза в 1,5% агаре.

Статистическую обработку результатов осуществляли при помощи компьютерного пакета программ "Statistica v.5.5" с использованием U-критерия Манна-Уитни ($P < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Влияние эмбриональных клеток оценивали по их способности контролировать оксидативный стресс, развивающийся при АПП. Для этого учитывали прооксидантный статус клеток печени (базальный уровень ТБК-активных продуктов, интенсивность неферментативного Fe^{2+} -аскорбатиндуцированного ПОЛ) и состояние антиоксидантной системы (активность её основных ферментов – глутатионпероксидазы и каталазы).

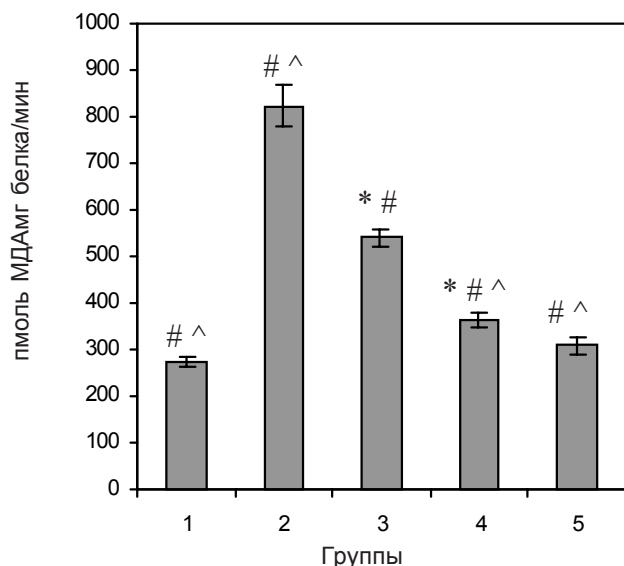


Рис. 1. Базальный уровень ТБК-активных продуктов в печени животных: 1 – интактные животные, 2 – окончание интенсивной алкоголизации, 3 – введение СКК, 4 – введение ЭКП, 5 – введение ЭКМ * – $P < 0,05$ по отношению к интактным животным, # – $P < 0,05$ по отношению к животным после развития АПП, ^ – $P < 0,05$ по отношению к животным, которым вводили СКК.

Базальный уровень ТБК-активных продуктов в печени животных после развития АПП составлял $823,3 \pm 43,5$ пмоль МДА/мг белка. В группе животных, которым вводили СКК, наблюдалось уменьшение этого показателя в 1,5 раза. По сравнению с предыдущей группой ЭКП приводили к снижению базального уровня ТБК-активных продуктов в печени животных в 1,5 раза, ЭКМ – в 1,8 раза, до значений интактного уровня (рис. 1).

Скорость накопления ТБК-активных продуктов по окончании интенсивной алкоголизации составляла $50,2 \pm 3,6$ пмоль МДА/мг белка/мин и не отличалась от значений в СКК-группе. Введение ЭКП или ЭКМ вызывало уменьшение этого показателя в 2,6 и 1,9 раза соответственно, что приводило к его нормализации (рис. 2).

Глутатионпероксидазная активность перед введением эмбриональных клеток составляла $0,118 \pm 0,01$ мкмоль GSSG/мг белка/мин, в СКК-группе – $0,142 \pm 0,01$. После применения ЭКП или ЭКМ показатель увеличивался в 1,7 раза, и достигал интактного уровня (рис. 3).

Активность каталазы после развития АПП составляла $60,7 \pm 2,6$ мкмоль H_2O_2 /мг белка за 1 мин, в СКК-группе – $68,0 \pm 2,9$. Введение ЭКП и ЭКМ нормализовало активность фермента (повышение в 1,8 и 2 раза соответственно, рис 4).

Общеизвестно, что процессы ПОЛ являются важным звеном метаболизма, которое находится под контролем системы антиоксидантной защиты. Развитие оксидативного стресса происходит в

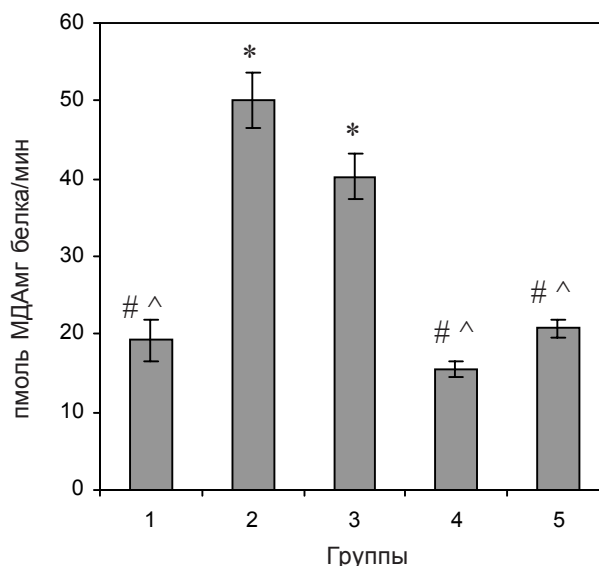


Рис. 2. Интенсивность индуцированного ПОЛ в печени животных: 1 – интактные животные, 2 – окончание интенсивной алкоголизации, 3 – СКК, 4 – ЭКП, 5 – ЭКМ. * – $P < 0,05$ по отношению к интактным животным, # – $P < 0,05$ по отношению к животным после развития АПП, ^ – $P < 0,05$ по отношению к животным, которым вводили СКК.

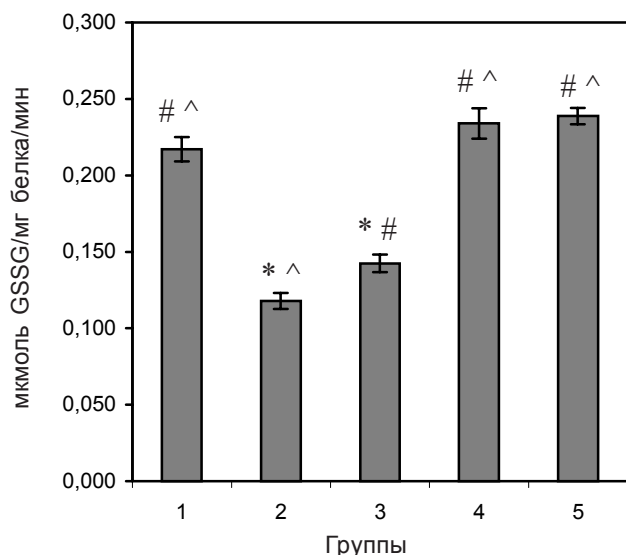


Рис. 3. Глутатионпероксидазная активность в печени животных: 1 – интактные животные, 2 – окончание интенсивной алкоголизации, 3 – СКК, 4 – ЭКП, 5 – ЭКМ. * – $P < 0,05$ по отношению к интактным животным, # – $P < 0,05$ по отношению к животным после развития АПШ, ^ – $P < 0,05$ по отношению к животным, которым вводили СКК.

условиях нарушения прооксидантно-антиоксидантного баланса под действием агентов, индуцирующих генерацию активных форм кислорода на фоне угнетения антиоксидантной активности. Одним из таких агентов является алкоголь, длительное поступление которого стимулирует микросомальную цитохром Р450-монооксигеназную систему. В процессе микросомального ПОЛ образуются потенциально опасные активные формы кислорода. При этом уровень эндогенных веществ, нейтрализующих свободные радикалы, снижен. Развивающийся оксидативный стресс приводит к нарушению функции основного структурного компонента клеточных мембран – фосфолипидов, что ведет к повышению проницаемости мембран, изменениям трансмембранного транспорта, функционирования клеточных рецепторов и мембраносвязанных ферментов [4]. Усиление ПОЛ является одним из важных механизмов нарушения функции митохондрий: подавляется окисление жирных кислот и ацетальдегида, снижается активность ферментов дыхательной цепи и угнетается окислительное фосфорилирование. Образующиеся при ПОЛ продукты распада активируют клетки Ито и стимулируют синтез коллагена [14].

Исходя из вышесказанного, одним из действенных способов уменьшения повреждающего действия этанола на печень может явиться применение агентов, препятствующих развитию оксидативного стресса. На основании полученных нами данных в таком качестве могут рассматриваться эмбриональные клетки, а именно ЭКП и

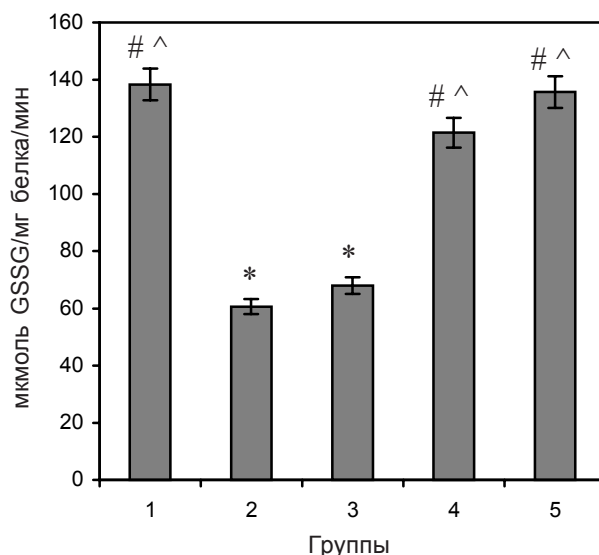


Рис. 4. Каталазная активность в печени животных: 1 – интактные животные, 2 – окончание интенсивной алкоголизации, 3 – СКК, 4 – ЭКП, 5 – ЭКМ. * – $P < 0,05$ по отношению к интактным животным, # – $P < 0,05$ по отношению к животным после развития АПШ, ^ – $P < 0,05$ по отношению к животным, которым вводили СКК.

ЭКМ, которые способны практически полностью нормализовать как интенсивность протекания перекисных процессов (базальный уровень и скорость накопления ТБК-активных продуктов), так и активность ферментов системы антиоксидантной защиты (глутатионпероксидазы, каталазы).

Эффективность применения эмбриональных клеток может быть обусловлена как влиянием биологически активных веществ, способных включаться в метаболические процессы, а также стимулировать репарацию в повреждённых тканях, так и прямой органозаместительной функцией вводимых клеток. Для проверки последнего предположения нами было проведено дополнительное исследование, в котором самкам крыс внутривенно вводили ЭКП или ЭКМ эмбрионов человека мужского пола, заражённые ЦМВ. Отбор клеток, принадлежащих эмбрионам мужского пола, и подтверждение их инфицированности ЦМВ проводились методом ПЦР. Таким образом, в качестве маркеров использовалась двойная метка: у-хромосома и ЦМВ. Спустя 14 дней при помощи ПЦР-диагностики было показано следующее распределение клеток: ЭКП были обнаружены в костном мозге, селезёнке и головном мозге; ЭКМ – в костном мозге и селезёнке. Следует отметить, что полной корреляции в распределении маркеров в каждой ткани выявлено не было. Отсутствие маркеров в печени позволяет предполагать, что в условиях данной модели механизм действия внутривенно введённых эмбриональных клеток не является органозаместительным.

Полученные результаты демонстрируют, что при внутривенном введении крысам с АПП эмбриональные клетки способны сохраняться, по крайней мере, в течение 14 дней. Таким образом, механизм нормализации прооксидантно-антиоксидантного баланса в печени, улучшения функционального состояния органа (снижение продолжительности гексеналового сна и протромбинового времени, повышение уровня альбумина в плазме крови) при алкогольном поражении, по-видимому, может быть связан с влиянием биологически активных веществ. Однако полностью исключить органозаместительный эффект тоже нельзя, поскольку изучение распределения эмбриональных клеток в органах и тканях животных проводилось однократно, спустя 14 дней с момента внутривенного введения. Доказательств их отсутствия в печени в более ранние сроки нет. С известными допущениями, можно предположить, что к четырнадцатому дню эмбриональные клетки могли быть уже элиминированы из печени или напротив, ещё не достигли “места назначения”. Для решения этих задач необходимо проведение дальнейших исследований по выяснению особенностей распределения эмбриональных клеток в другие сроки.

Особо нужно отметить, что положительное влияние эмбриональных клеток отмечалось на фоне продолжающегося приёма алкоголя. Это позволяет надеяться, что полученные в работе данные могут быть использованы при разработке новых терапевтических подходов в лечении АПП.

Выводы

1. Влияние криоконсервированных эмбриональных клеток печени и головного мозга реализуется посредством угнетения перекисных процессов (снижение базального уровня ТБК-активных продуктов, интенсивности неферментативного Fe^{2+} -аскорбат-индуцированного ПОЛ) и стимуляции ферментативной антиоксидантной системы (повышение активности глутатионпероксидазы и каталазы).

Через две недели после внутривенного введения крысам с АПП эмбриональные клетки печени были обнаружены в костном мозге, селезёнке и головном мозге; эмбриональные клетки головного мозга – в костном мозге и селезёнке. Отсутствие эмбриональных клеток в печени позволяет предполагать, что механизм их действия не является органозаместительным.

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. Бабак О.Я. Панкреатические ферменты в лечении больных с алкогольным поражением печени и поджелудочной железы // Сучасна гастроентерологія.– 2002.– №1(7).– С. 33-35.
3. Бабюк И.А., Сосин И.К., Калиниченко О.Б. и др. Алкогольная и наркотическая зависимость у подростков. Донецк-Харьков: Донеччина, 2004.– 192 с.
4. *Болезни печени и желчевыводящих путей*: Руководство для врачей/ Под ред. В. Т. Ивашкина.– М.: ООО “Издательский дом “М-Вести”, 2002.– 416 с.
5. Владимирцов Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.– М.: Наука, 1972.– 252 с.
6. Ерышев О. Ф., Рыбакова Т. Г., Шабанов П. Д. Алкогольная зависимость: формирование, течение, противорецидивная терапия.– СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2002.– 192 с.
7. Ковалёв Г. А., Петренко А.Ю. Экспериментальная модель алкогольного поражения печени у самок крыс. // Вісник Харківського національного університету ім. В. Н. Каразіна.– 2004ю– №617.– С.14-18.
8. Ковалёв Г.А., Черкашина Д.В., Петренко А.Ю. Показатели прооксидантно-антиоксидантной системы печени самок крыс при алкогольном поражении // Сучасна гастроентерологія.– 2005.– №4(24).– С. 51-54.
9. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. Метод определения активности каталазы // Лаб.дело.– 1988.– №1.– С.16-19.
10. Кухарчук А.Л., Радченко В.В., Сирман В.М. Стволовые клетки: эксперимент, теория, клиника. Эмбриональные, мезенхимальные, нейральные и гемопоэтические стволовые клетки.– Черновцы: Золоті литаври, 2004.– 505 с.
11. Маевская М.В. Алкогольная болезнь печени // Клинические перспективы в гастроэнтерологии, гепатологии.– 2001.– №1.– С. 4-8.
12. Петренко А.Ю., Ковалёв Г.А., Грищенко В.И. Внутривенное введение эмбриональных нервных клеток крысам с хроническим отравлением алкоголем // Пробл. криобиологии.– 2005.– Т. 15, №1.– С. 71-78.
13. Черкашина Д.В., Оченашко О.В., Петренко О.Ю. Захист печінки від гострого отруєння тетрахлорметаном препаратами ембріонального походження // Трансплантологія.– 2003.– Т. 4, №1.– С. 49-50.
14. Шерлок Ш., Дули Дж. Заболевания печени и желчных путей: Практич. рук-во.– М.: ГОЭТАР-МЕД, 2002.– 864 с.
15. Brind A, Hurlstone A, Edrington D. et al. The role of polymorphisms of glutathione S-transferases GSTM1, M3, P1, T1 and A1 in susceptibility to alcoholic liver disease // Alcohol.– 2004.– Vol. 39, N6.– P. 478-483.
16. Rotruck J., Pope A., Ganther H. et al. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase // Science.– 1973.– Vol. 179, N73.– P. 588-590.