

Саногенетические механизмы действия трансплантации целых клеток и их ядерной фракции на модели экспериментальной дислипидемии

Пивоваров Ю.И.¹, Курильская Т.Е.¹, Сергеева А.С.¹, Бабушкина И.В.¹, Бадуюев Б.К.², Боровский Г.Б.²

Sanogenetic mechanisms of transplantation action of the whole cells and their nuclear fraction on experimental dislipoproteinemia model

Pivovarov Yu.I., Kurilskaya T.Ye., Sergeeva A.S., Babushkina I.V., Baduyev B.K., Borovsky G.B.

¹ Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии СО РАМН, г. Иркутск

² Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск

© Пивоваров Ю.И., Курильская Т.Е., Сергеева А.С. и др.

С целью сравнения эффектов трансплантации клеток и их ядер на модели алиментарной дислипидемии выполнен эксперимент на кроликах, содержащихся на атерогенной диете. В сыворотке крови животных изучали изменения липидного обмена, в печени — уровень стресс-белков, морфологические изменения и содержание белков-маркеров апоптоза и пролиферации. Также оценивали площадь атерогенных бляшек и толщину интимы аорты. Показано, что в отличие от клеточной трансплантации введение ядер приводило к более выраженному терапевтическому эффекту и торможению экспансии ведущих звеньев атерогенеза.

Ключевые слова: трансплантация клеток и ядер, дислипидемия.

Research objective was to compare effects of transplantation of cells and their nucleus on model alimentary dislipoproteinemia. Experiment is executed on the rabbits containing on an atherogenous diet. In blood serum of animals studied changes of a lipide exchange, in a liver — level of stresses-proteins, morphological changes and the maintenance of markers of an apoptosis and a proliferation. Also estimated the area of atherogenous plaques and a thickness of intima of an aorta. It is shown that unlike cellular transplantation, introduction of nucleus led to more expressed therapeutic effect and inhibition of expansion of leading links of an atherogenesis.

Key words: transplantation of cells and nucleus, dislipoproteinemia.

УДК 616.153.915-021.6-089.819.843:577.115

Введение

В последние годы интересы научной общественности сосредоточены на исследовании и клиническом внедрении трансплантации аутологичных стволовых клеток. Однако анализ данных литературы показывает, что полученные эффекты трансплантации таких клеток мало чем отличаются от результатов, выявленных при трансплантации неонатальных, эмбриональных или генмодифицированных клеток в условиях различных моделей экспериментальной патологии [1, 6, 7, 9]. Дан-

ный факт свидетельствует о том, что трансплантация различных видов клеток способствует активации единых саногенетических механизмов органов и систем реципиента. Клеточная терапия связана с действием одних и тех же структурно-функциональных компонентов трансплантата, в ответ на которое активируются регуляторные системы реципиента. В связи с этим определение роли названных компонентов в восстановлении поврежденного органа представляется одним из ключевых моментов для понимания механизмов действия клеточной терапии. Стратегия последо-

вательного выделения отдельных функциональных и структурных компонентов из культуры трансплантируемых клеток и изучение их влияния на саногенетические механизмы в поврежденном органе являются перспективными. На первом этапе исследований представлялось важным установить прежде всего эффективность таких основных субклеточных образований, как ядра трансплантата, на течение патологического процесса.

Цель исследования — изучить особенности саногенетических эффектов трансплантации неонатальных клеток печени и их ядер на модели экспериментальной дислипидемии.

Материал и методы

Исследование выполнено на кроликах породы «шиншилла» ($n = 70$) массой тела 2,0—2,5 кг в осенне-зимний период. Животные содержались в условиях вивария (НЦ РВХ СО РАМН (г. Иркутск), виварий I категории, вет. удостоверение 238 № 0015220 от 25 марта 2009 г., служба ветеринарии Иркутской области) при свободном доступе к воде и пище (стандартный рацион) соответственно нормативам ГОСТа «Содержание экспериментальных животных в питомниках НИИ».

Экспериментальную гиперхолестеролемию (ГХС) индуцировали атерогенной диетой (АД) путем ежедневного скармливания животным холестерина из расчета 250 мг/кг массы тела. Эксперимент проводился в течение 90 дней. Животные были разделены на четыре группы: 1-я группа (контроль, $n = 23$) находилась на АД; кроликам 2-й группы ($n = 21$) на фоне АД дважды (на 30-е и 75-е сут) внутривенно трансплантировали неонатальные клетки печени ($1 \cdot 10^6$ клеток/кг массы тела). Животным 3-й группы ($n = 21$) в те же сроки вводили внутривенно ядра клеток неонатальной печени (из расчета того же количества клеток).

Неонатальные клетки получали путем ферментативной дезагрегации гомогената печени 1—2-суточных кроликов по общепринятой методике [2]. Ядерную фракцию клеток неонатальной печени получали с помощью дифференциального центрифугирования [3]. Жизнеспособность клеток оценивалась с помощью трипанового синего в камере Горяева. Во всех случаях трансплантат подвергался цитологическому контролю с помощью световой и электронной микроскопии.

В сыворотке крови исследовались изменения липидного обмена (общий холестерол (ХС), ХС липопротеинов высокой, низкой и очень низкой плотности (ЛПВП, ЛПНП, ЛПОНП) и триглицериды (ТГ)) на биохимическом анализаторе «Roki Ольвекс» (г. Москва) с использованием реагентов фирмы Bioson (Германия). В ткани печени изучали уровень стресс-белков класса БТШ70 (с использованием иммуноблоттинга), морфологические изменения и содержание белков — маркеров апоптоза и пролиферации (Bcl-2 и Bcl-Xs, PCNA, Ki-67, p-53). Белки — маркеры апоптоза и пролиферации определяли иммуноморфологическим методом с помощью моноклональных антител фирмы Dako Cytomatio (Дания): p53 Protein clone DO-7, Ki-67 Antigen clone MIB-1, Bcl-2 Oncoprotein clone 124; фирмы Novocastra (Великобритания): NCL-PCNA clone PC10 и Bcl-Xs clone NC1. Связывание первичных антител выявляли с помощью стрептавидин-биотинового набора LSAB+ (DakoCytomation). В качестве хромогенного субстрата использовали DAB, ядра докрашивали гематоксилином. Выраженность торможения апоптоза и репарации ДНК определяли с помощью коэффициента торможения апоптоза (КТА) Bcl-2/Bcl-Xs и индекса репарации ДНК (ИР ДНК) PCNA/Ki67. Кроме того, в каждой группе животных оценивали площадь атерогенных бляшек и толщину интимы аорты. Для сравнения ряда морфофункциональных показателей пяти кроликам давалась стандартная диета. Животные выводились из эксперимента на 45-е и 90-е сут.

Морфологическая обработка материала была проведена с использованием стандартных аппаратных методов фиксации, проводки и окраски ткани. Визуализацию, обработку и морфометрию образцов печени выполняли с помощью компьютерной видеосистемы Quantimet 550IW, статистического программного пакета морфометрии Leica Q-Win16 (Великобритания) и программы количественного анализа изображений «Видео-Тест-Мастер 4.0» (Россия).

Для определения значимости различий полученных данных в сравниваемых группах использовали непараметрический критерий Манна—Уитни, для внутригрупповых сравнений применяли критерии Вилкоксона и Краскала—Уоллиса. Степень связи изучаемых параметров оценивали с помощью ранговой корреляции Спирмена r . Поскольку не все исходные показатели в разных группах были сопоставимы, то для сравнительного анализа данных в этом случае ис-

пользовался коэффициент пропорциональности: $KП = (x_2 - x_1)/x_1$, где x_1 — исходный показатель, x_2 — показатель через 45 или 90 сут. Все результаты представлены в виде медианы Me и перцентилей 25—75% (Q_{25} ; Q_{75}). Отличия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

К 45-м сут АД у животных контрольной группы и реципиентов с трансплантацией клеток (ТК) произошли заметные сдвиги практически во всех изучаемых показателях липидного обмена (табл. 1). Так, в сравнении с исходными данными холестероловая нагрузка животным контрольной группы приводила к существенному увеличению содержания общего ХС, ХС ЛПНП и коэффициента атерогенности (КА). Она способствовала также повышению ТГ на 142%. Результаты, полученные на животных с ТК, свидетельствовали о некотором позитивном воздействии однократно введенного трансплантата на показатели липидного спектра. Для этих животных было характерно наличие менее выраженного подъема концентраций общего ХС, ХС ЛПНП и КА, чем в контрольной группе. В группе реципиентов с трансплантацией ядер (ТЯ) подобных явлений не наблюдалось. Все изучаемые параметры, за исключением не столь значительного роста уровня ХС ЛПНП, по сравнению с другими группами (на 110%) фактически оставались на исходном уровне (табл. 1).

Эти факты указывали на то, что ТЯ способствовала более выраженному сдерживанию развития гиперхолестеролемии, чем ТК, поскольку в начальный период холестероловой нагрузки она обеспечивала лучшую коррекцию липидного дисбаланса.

К 90-м сут АД явления дислипидемии, отмеченные в первой половине эксперимента, продолжали нарастать как в контрольной группе, так и в опытах с ТК (табл. 1). У животных контрольной группы уровень ХС ЛПНП вырос на 16,5%, а ХС ЛПОНП — на 126% по сравнению со значениями, полученными на 45-е сут наблюдения. Полученные данные у животных с ТК свидетельствуют о практически том же темпе нарастания дислипидемии, что и у контрольных животных. Результаты, полученные у животных с ТЯ, значительно отличались от данных этих двух экспериментальных групп. Здесь фактически не было выявлено каких-либо отклонений от показателей, полученных на 45-е сут АД. Кроме того, определялась даже некоторая тенденция к дальнейшему снижению уровня ТГ и ХС ЛПНП. Что касается увеличения КА, который тем не менее был ниже, чем в других группах, то оно могло происходить только за счет несущественного повышения уровня общего ХС и незначительного снижения ХС ЛПВП в этот период (табл. 1).

По мере развития атерогенного процесса во всех экспериментальных группах уровень общей (БТШ70) и индуцибельной (БТШ72) цитоплазматических фракций стресс-белков класса БТШ70 оставался неизменным либо снижался (табл. 2). Тем не менее на 45-е сут АД уровень продукции БТШ72 у контрольных животных был достоверно выше, чем в опытах с ТК и ТЯ, который, однако, уже к 90-м сут практически ничем не отличался от уровня продукции БТШ72 клетками печени опытных животных. В то же время в группе с ТЯ содержание этого белка нарастало более интенсивно, чем у реципиентов с ТК (табл. 2). Эти данные свидетельствовали об относительно большей сохранности механизмов защиты клеток печени у животных с ТЯ от внутриклеточных повреждений белков патогенными факторами.

Таблица 1

Характер отклонения липидных фракций сыворотки крови у животных трех экспериментальных групп в условиях атерогенной диеты в разные сроки эксперимента (Me (Q_{25} ; Q_{75}))

Показатель	1-я группа	2-я группа	3-я группа	$p < 0,05$ (по критерию Манна—Уитни)
45-е сут атерогенной диеты				
Общий ХС, ммоль/л	8,10 (3,90; 14,10)	1,95 (0,60; 5,20)	-0,10 (-0,49; 0,75)	$p_{1-2}; p_{1-3}; p_{2-3}$
ХС ЛПНП, ммоль/л	23,70 (6,90; 35,60)	11,2 (4,00; 24,90)	1,10 (-0,23; 2,90)	$p_{1-3}; p_{2-3}$
ХС ЛПОНП, ммоль/л	1,37 (0,0; 4,27)	-0,25 (-0,47; -0,06)	0,07 (-0,37; 0,23)	$p_{1-2}; p_{1-3}$
ХС ЛПВП, ммоль/л	-0,43 (-0,54; -0,26)	0,13 (-0,13; 0,33)	-0,02 (-0,25; 0,44)	$p_{1-2}; p_{1-3}$
КА, ед.	11,50 (5,80; 35,20)	4,40 (0,97; 5,80)	-0,02 (-0,25; 1,10)	$p_{1-2}; p_{1-3}$
ТГ, ммоль/л	1,420 (-0,16; 3,40)	-0,32 (-0,52; -0,07)	-0,29 (-0,52; -0,13)	$p_{1-2}; p_{1-3}$
90-е сут атерогенной диеты				
Общий ХС, ммоль/л	9,79 (6,20; 15,50)	3,90 (2,10; 5,80)	0,12 (-0,07; 1,20)	$p_{1-2}; p_{1-3}; p_{2-3}$

ХС ЛПНП, ммоль/л	27,60 (18,60; 47,60)	17,00 (9,80; 28,20)	0,79 (0,26; 3,50)	$p_{1-3}; p_{2-3}$
ХС ЛПОНП, ммоль/л	3,10 (1,40; 5,80)	0,09 (-0,25; 0,34)	-0,30 (-0,60; 0,57)	$p_{1-2}; p_{1-3}$
ХС ЛПВП, ммоль/л	0,04* (-0,20; 0,32)	0,23 (0,03; 0,40)	-0,08 (-0,41; 0,19)	
КА, ед.	12,40 (10,90; 32,20)	5,00 (2,60; 8,30)	0,73 (0,57; 4,80)	$p_{1-2}; p_{1-3}$
ТГ, ммоль/л	3,80 (1,03; 6,50)	0,12* (-0,23; 0,37)	-0,47 (-0,66; -0,02)	$p_{1-2}; p_{1-3}$

* $p < 0,05$ для одного и того же параметра в сравнении с 45-ми сут (по критерию Вилкоксона). Переменные даны в виде коэффициентов пропорциональности к исходным значениям.

Т а б л и ц а 2

Уровень стресс-белков класса БТШ70 (БТШ70 и БТШ72) в печени и сердечной ткани животных экспериментальных групп в разные сроки атерогенной диеты (Me (Q_{25} ; Q_{75})), усл. ед.

Показатель	1-я группа		2-я группа		3-я группа		$p < 0,05$ (по критерию Манна—Уитни)
	Печень	Сердце	Печень	Сердце	Печень	Сердце	
45-е сут атерогенной диеты							
БТШ70	2,90 (2,80; 3,00)	2,70 (2,50; 2,90)	3,10 (2,90; 3,40)	2,75 (2,50; 2,90)	3,00 (2,80; 3,40)	2,60 (2,40; 2,80)	
БТШ72	2,50 (2,30; 2,70)	1,70 (1,60; 1,90)	1,90 (1,70; 2,10)	1,40 (1,30; 1,50)	2,00 (1,70; 2,10)	1,50 (1,40; 1,70)	p_{1-2}, p_{1-3} (печень); $p_{1-2}; p_{1-3}$ (сердце)
90-е сут атерогенной диеты							
БТШ70	2,10* (2,00; 2,20)	2,90 (2,70; 3,00)	3,20 (3,10; 3,40)	2,00* (2,10; 2,30)	2,90 (2,70; 3,00)	2,6 (2,50; 2,70)	p_{1-2}, p_{1-3} (печень); $p_{1-2}, p_{1-3}, p_{2-3}$ (сердце)
БТШ72	2,00* (1,90; 2,10)	1,40* (1,30; 1,50)	1,90 (1,90; 2,00)	1,30 (1,20; 1,40)	2,10 (2,00; 2,20)	1,4 (1,30; 1,50)	p_{2-3} (печень)

* $p < 0,05$ для одного и того же параметра в сравнении с 45-ми сут (по критерию Краскала—Уоллиса).

Хроническая холестероловая нагрузка также существенно влияла на содержание белков-маркеров апоптоза и пролиферации в печени животных различных экспериментальных групп. Так, через 45 сут АД уровень исследуемых белков во всех экспериментальных группах был существенно выше, чем у здоровых животных (табл. 3). Вместе с тем результаты, полученные в контрольной группе, значительно отличались от показателей опытных животных. Так, уровень белков p53 и Bcl-Xs в печени этих животных был достоверно выше, чем у доноров с ТК и ТЯ, что свидетельствовало о развитии у них в этот период более выраженного процесса апоптоза. На это указывали также самый низкий уровень белка-репрессора апоптоза (Bcl-2) и коэффициент его торможения (КТА). Правда, при сопоставимых уровнях индуктора ядерной пролиферации (PCNA) и меньшем содержании белка Ki-67 индекс репарации ДНК (ИР ДНК) в контроле был несколько выше, чем в других группах. Что же касается опытных животных, то здесь все межгрупповые показатели к 45-м сут АД были сопоставимы (табл. 3).

К 90-м сут у животных контрольной группы произошло существенное подавление клеточного апоптоза за счет повышения уровня Bcl-2 и снижения содержания в печени индуктора апоптотического процесса (Bcl-Xs)

и белка p53 (табл. 4). Такое явление было связано, по-видимому, с возрастающей деструкцией клеток печени, вызванной хронической холестероловой нагрузкой и снижением в связи с этим числа скомпрометированных клеток, требующих элиминации с помощью механизма апоптоза. Наряду с этим величина ИР ДНК оставалась неизменной и даже немного снизилась за счет большего темпа нарастания Ki-67 (табл. 4).

К 90-м сут АД в опытных группах был установлен ряд особенностей, существенно различающих ответную реакцию клеток печени животных на хроническую холестероловую нагрузку при повторной трансплантации клеток и ядер. У животных этих групп выявлялись такие главные отличительные признаки, как неоднотипный характер апоптоза и разная направленность процессов репарации ДНК. Так, если у животных с ТК процесс апоптоза продолжал оставаться фактически на прежнем уровне, то у животных с ТЯ он существенно замедлялся прежде всего за счет снижения продукции клетками печени проапоптотического белка Bcl-Xs и увеличения синтеза белка Bcl-2, тормозящего этот процесс. Наряду с этим процессы репарации ДНК в клетках печени были значительно интенсивнее, чем у животных с ТК, очевидно, в связи с большим темпом экспрессии белка PCNA, чем белка Ki-67 (табл. 4).

Т а б л и ц а 3

Изменения показателей выраженности апоптоза и пролиферации в печени экспериментальных животных на 45-е сут атерогенной диеты (Me (Q_{25} ; Q_{75}))

Показатель	Здоровые животные	1-я группа	2-я группа	3-я группа	$p < 0,05$ (по критерию)
------------	-------------------	------------	------------	------------	--------------------------

					Манна—Уитни)
p53, усл. ед.	4,42 (4,08; 4,70)	12,38* (10,60; 13,30)	8,11* (7,70; 9,10)	6,38* (6,13; 9,40)	$p_{1-2}; p_{1-3}$
PCNA, усл. ед.	0,05 (0,03—0,08)	7,00* (6,90; 7,80)	8,61* (7,60; 8,80)	8,12* (7,50; 8,35)	
Ki-67, усл. ед.	0,03 (0,01—0,04)	4,30* (4,00; 14,50)	6,83* (6,32; 7,70)	6,17* (5,36; 7,10)	$p_{1-2}; p_{1-3}$
ИР ДНК, ед.	2,67 (1,42; 3,50)	1,60 (1,50; 1,70)	1,20 (1,13; 1,27)	1,32 (1,20; 1,38)	$p_{1-2}; p_{1-3}$
Vcl-2, усл. ед.	0,10 (0,07; 0,15)	0,02* (0,01; 0,03)	0,38* (0,31; 0,39)	0,42* (0,33; 0,54)	$p_{1-2}; p_{1-3}$
Vcl-Xs, усл. ед.	4,82 (3,6; 4,88)	15,90* (13,00; 16,60)	10,50* (10,20; 11,50)	12,36* (9,80; 13,30)	$p_{1-2}; p_{1-3}$
КТА, ед.	0,02 (0,02; 0,05)	0,001* (0,001; 0,002)	0,033 (0,028; 0,038)	0,032 (0,03; 0,06)	$p_{1-2}; p_{1-3}$
АТ, ед.	—	19,40 (17,60; 22,30)	17,20 (15,60; 18,60)	17,35 (14,20; 18,20)	

Примечание. АТ — апоптотические тельца; * — $p < 0,05$ в сравнении со здоровыми животными.

Таблица 4

Изменения показателей выраженности апоптоза и пролиферации в печени экспериментальных животных на 90-е сут атерогенной диеты (Me ($Q_{25}; Q_{75}$))

Показатель	1-я группа	2-я группа	3-я группа	$p < 0,05$ (по критерию Манна—Уитни)
p53, усл. ед.	3,90* (3,45; 3,92)	7,52* (6,90; 7,80)	6,64 (6,30; 7,20)	$p_{1-2}; p_{1-3}$
PCNA, усл. ед.	8,35* (8,16; 9,11)	11,20* (10,60; 12,50)	10,30* (9,75; 10,50)	
Ki-67, усл. ед.	5,75* (5,66; 6,21)	9,30* (8,70; 9,60)	7,17 (6,70; 7,50)	$p_{1-2}; p_{1-3}$
ИР ДНК, ед.	1,36 (1,34; 1,65)	1,24 (1,12; 1,36)	1,38 (1,35; 1,56)	$p_{1-2}; p_{1-3}$
Vcl-2, усл. ед.	0,98* (0,77; 1,10)	0,32 (0,30; 0,35)	0,57* (0,40; 0,53)	$p_{1-2}; p_{1-3}$
Vcl-Xs, усл. ед.	8,10* (7,25; 8,83)	10,00 (9,20; 10,60)	8,30* (7,70; 9,13)	$p_{1-2}; p_{1-3}$
КТА, ед.	0,11* (0,10; 0,13)	0,032 (0,03; 0,035)	0,064* (0,06; 0,08)	$p_{1-2}; p_{1-3}$
АТ, ед.	10,40* (9,56; 10,47)	14,60* (13,20; 15,20)	12,46* (12,10; 12,90)	

* $p < 0,05$ в сравнении с 45-ми сут эксперимента (по критерию Краскала—Уоллиса).

Вероятно, к 90-м сут АД в печени животных с повторной ТК оставалось больше суицидных клеток с поврежденной ДНК, репарация которой была уже невозможна, чем в печени доноров с двукратным введением ядерного трансплантата. Отсюда, возможно, у животных с повторной ТЯ и наблюдалась более выраженная сопряженность процессов апоптоза и пролиферации, которые даже в нормальных условиях находятся в постоянном неустойчивом равновесии. Наряду с более высоким ИР ДНК, чем в группе с ТК, продукция белка p53 в печени этих животных оставалась фактически на прежнем уровне, что также косвенно подтверждало наличие у животных с ТЯ большего количества печеночных клеток с восстановленной ДНК.

На 45-е сут АД у животных всех экспериментальных групп выявлялись гепатоциты с тотальной крупнокапельной жировой дистрофией, причем самый высокий процент поражения клеток этим процессом определялся в контрольной группе. Та же закономерность наблюдалась и в отношении степени

некроза ткани печени и уровня ее инфильтрации лейкоцитарными клетками (табл. 5).

В последующий период наблюдения (90-е сут) было установлено дальнейшее усиление клеточной инфильтрации ткани печени и нарастание в ней деструктивных процессов, однако выраженность этих явлений в разных группах носила уже более контрастный характер, чем на 45-е сут атерогенной диеты.

Введение ядер неонатальных клеток печени более эффективно, чем ТК, замедляло развитие деструктивных процессов в печени и аорте, которые наблюдались при хронической холестероловой нагрузке. К концу эксперимента в этой группе животных определялся более низкий процент поражения гепатоцитов жировой дистрофией и некротическим процессом (соответственно на 5 и 4% ниже, чем в группе с ТК). Параллельно с этим процессы прогрессирования и развития атеросклероза в аорте проходили существенно медленнее, чем при ТК. Так, в опытах с ТЯ толщина интимы аорты в 1,4 раза, а площадь атерогенных бляшек в 1,6 раза были меньше, чем в группе животных с ТК.

Таблица 5

Структурные изменения в печени животных экспериментальных групп в различные сроки атерогенной диеты (Me ($Q_{25}; Q_{75}$))

Показатель	1-я группа	2-я группа	3-я группа	$p < 0,05$ (по критерию
------------	------------	------------	------------	-------------------------

	45-е сут атерогенной диеты			Манна—Уитни)
ЖДГ, %	43,50 (39,20; 49,30)	34,30 (31,50; 40,70)	31,80 (27,20; 44,10)	
ПН, %	13,40 (13,40; 14,60)	9,76 (9,40; 10,60)	9,33 (7,39; 11,20)	$p_{1-2}; p_{1-3}$
КИ, ед.	13,30 (11,60; 26,70)	11,30 (10,60; 12,10)	10,40 (9,25; 11,50)	p_{1-3}
	90-е сут атерогенной диеты			
ЖДГ, %	93,20* (89,70; 93,30)	60,20* (58,30; 63,20)	55,30* (52,70; 58,00)	$p_{1-2}; p_{1-3}; p_{2-3}$
ПН, %	27,80* (27,30; 28,50)	15,80* (14,70; 17,90)	13,20* (11,20; 14,90)	$p_{1-2}; p_{1-3}$
КИ, ед.	37,30* (33,70; 38,50)	21,40* (19,40; 24,00)	15,70* (13,90; 17,60)	$p_{1-2}; p_{1-3}; p_{2-3}$

Примечание. ЖДГ — жировая дистрофия гепатоцитов; ПН — площадь некроза ткани печени; КИ — клеточный индекс (рассчитывается в 30 срезах ткани при площади одного среза 10 000 мкм², исходя из среднего суммарного количества клеток инфильтрата); * — $p < 0,05$ для одного и того же параметра в сравнении с 45-ми сут (по критерию Краскала—Уоллиса).

Параллельно с патологическими изменениями в печени было отмечено увеличение толщины интимы стенки аорты, появление в ней атероматозных бляшек различного размера. Так, по мере увеличения сроков кормления животных холестерином эти атерогенные явления в аорте нарастали, особенно в контрольной группе и в опытах с ТК, хотя в последнем случае липидная инфильтрация интимы аорты была менее выраженной, чем в контроле. В то же время процессы прогрессирования атеросклероза в аорте животных с ТЯ проходили существенно медленнее, чем в остальных экспериментальных группах.

В настоящее время общепризнано, что в основе развития атеросклероза лежит системная воспалительная реакция (СВР). Некоторые авторы считают, что СВР на фоне дислипидемии протекает по механизму аутоиммунного воспаления, которое приводит в конечном итоге к развитию гиперчувствительности замедленного типа [5].

Этот воспалительный процесс, например при алиментарной дислипидемии, развивается в ответ на накопление в плазме модифицированных липопротеидов в результате перекисного окисления или энзиматической их деградации, вследствие чего молекулы апо-белков (апоВ-100 или апоЕ) липопротеидов изменяют свою конформацию. При длительной циркуляции в крови перекисно-модифицированных апо-белков, содержащих ЛПНП и ЛПОНП, они приобретают свойства аутоантигенов в виде пептидных фрагментов МДА-апо-белков (В-100 или Е), на которые могут вырабатываться многочисленные специфические антитела [10].

По-видимому, такая повышенная утилизации липопротеидов могла быть обусловлена в том числе и дополнительной экспрессией ядерным трансплантатом генов-индукторов синтеза рецепторов В-100-Е в

клетках эндотелия и интимы сосудов или сквенеджер-рецепторов клеток моноцитарно-макрофагального ряда, возможно, с последующим усилением внутриклеточного микросомального окисления липопротеидов низкой плотности. Основанием для этого служат косвенные данные. Так, исследования на культуре перитонеальных макрофагов показали, что индукция в клетках бенз[а]пиренгидроксилазы приводит к усилению окисления ЛПНП в среднем в 2 раза, как определялось по накоплению ТБК и деградации ¹²⁵I-меченых ЛПНП макрофагами. Ингибиторы монооксигеназ снижали окисление ЛПНП, однако они не действовали в отсутствие стимулирующего эффекта бенз[а]пиренгидроксилазы [4]. Окисление ЛПНП наблюдалось при инкубации с выделенными микросомами в присутствии NADPH и NADPH-цитохром Р450-редуктазы [6].

Анализ взаимодействия уровня стресс-белков в печени и исследуемых показателей липидного спектра показал, что повышение количества атерогенных липидных фракций у животных контрольной группы сопровождалось снижением уровня БТШ72 в печени ($r = -0,61$; $p < 0,05$), т.е. угнетению одного из механизмов защиты белков клеток печени от повреждения. При этом сам по себе факт большего количества БТШ72, чем в других экспериментальных группах, не дает основания считать, что даже такой его уровень был достаточно эффективным, чтобы предупредить дальнейшее повреждение внутриклеточных белков печени. В данной ситуации, очевидно, при возрастании системного окислительного стресса [1] репрессия гена, ответственного за синтез индуктора торможения апоптоза (ВсL-2), на фоне усиленной продукции белка р53 и ВсL-Xs могла снижать количество функционирующих клеток печени в результате индукции апоптоза, кото-

рый выступал уже в качестве дополнительного патогенного фактора преждевременной клеточной смерти.

В отличие от контрольных опытов у животных с ТК и ТЯ подъем уровня атерогенных липидов (в частности ЛПОНП), вызванный холестероловой нагрузкой, был положительно связан с уровнем БТШ72 в печени ($r = 0,71$; $p < 0,05$ и $r = 0,65$; $p < 0,05$ соответственно), т.е. усиление печенью синтеза ЛПОНП вследствие холестероловой нагрузки сопровождалось повышением продукции индуцибельных стресс-белков в печеночных клетках. Это свидетельствовало о достаточно выраженной сохранности у этих животных механизмов защиты внутриклеточных белков от повреждения. Кроме того, выяснилось, что процесс апоптоза в печени этих животных был менее выраженным, вероятно, за счет усиленной продукции клетками Bcl-2 в ответ на окислительный стресс (животные с ТК) или некротическое повреждение ткани печени (животные с ТЯ).

Отмеченные особенности системного и клеточно-го реагирования животных на введение разных структурно-функциональных единиц трансплантата в начальный период холестероловой нагрузки обусловили, по-видимому, последующую скорость развития атерогенного процесса, в том числе и на повторное введение клеток или ядер неонатальной печени, и определили более существенное различие в характере их ответных реакций к 90-м сут атерогенной диеты.

Выводы

1. Введение в организм экспериментальных животных ядер клеток неонатальной печени более эффективно предупреждает развитие дислипидемии и деструктивных процессов в печени, которые развивались под воздействием атерогенной диеты. Показано, что введение ядер клеток печени способствовало развитию адекватной и сопряженной индукции процессов апоптоза и пролиферации клеток печени реципиентов, что приводило к более эффективной координации резервных возможностей внутриклеточных механизмов адаптации органа-мишени к хронической холестероловой нагрузке.

2. В отличие от клеточной трансплантации введение ядер печеночных клеток приводило к более выраженному терапевтическому эффекту и торможению экспансии ведущих звеньев патогенеза. Наблюдаемые явления после трансплантации ядер, возможно, связаны с более эффективным влиянием ядерных, чем всех клеточных, компонентов трансплантата на геном клеток реципиента (в том числе клеток сосудистой стенки и печени), следствием которого, вероятно, являлась адекватная и направленная индукция внутриклеточных защитных и адаптивных механизмов против действия патогенных факторов.

Литература

1. *Атеросклероз и клеточная терапия* / А.А. Рунович, Ю.И. Пивоваров, Т.Е. Курильская и др.; под ред. А.А. Руновича, Ю.И. Пивоварова, Т.Е. Курильской. Иркутск: Дом печати, 2005. 304 с.
2. *Гепатоцит: функционально-метаболические свойства* / под ред. Л.Д. Лукьянова. М.: Наука, 1985. 283 с.
3. *Дорохов Д.Б., Клоке Э.* Быстрая и экономичная технология RAPD анализа растительных геномов // *Генетика*. 1997. Т. 33. С. 443—450.
4. *Душкин М.И., Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б. и др.* Влияние ингибитора цитохрома P450 на окислительный метаболизм липопротеинов низкой плотности макрофагами // *Вопр. мед. химии*. 1996. Т. 42, вып. 1. С. 23—30.
5. *Клименко Е.Д., Володина А.В., Кобозева Л.П. и др.* Регенерационная клеточная терапия патогенетических нарушений при дислипидемии и на ранних стадиях атерогенеза // *Биологические резервы клеток костного мозга и коррекция органных дисфункций* / под ред. В.И. Шумакова, Н.А. Онищенко. М.: Лавр, 2009. С. 153—167.
6. *Корочкин Л.И.* Стволовые клетки в нейрогенетике // *Генетика*. 2004. № 6. С. 787—793.
7. *Курильская Т.Е.* Патогенетическое обоснование фетальной терапии в профилактике и комплексном лечении ишемической болезни сердца: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Иркутск, 1999. 35 с.
8. *Aviram M. A., Kent U.M., Hollenberg P.F.* Microsomal cytochromes P450 catalyze the oxidation of low density lipoprotein // *Atherosclerosis*. 1999. V. 143. P. 253—260.
9. *Gunsalus J.R., Mitaki M.A., Szabo G.K. et al.* Reduction of serum cholesterol in Watanabe rabbits by xenogenetic hepatic transplantation // *Nature Med*. 1997. V. 1. P. 48—53.
10. *Nilsson J.H., Hansson G.K., Shan P.K.* Immunomodulation of atherosclerosis. Implications for vaccine development // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2005. V. 25. P. 18—28.

Поступила в редакцию 05.04.2011 г.

Утверждена к печати 20.09.2011 г.

Пивоваров Ю.И., Курильская Т.Е., Сергеева А.С. и др. Саногенетические механизмы действия трансплантации целых клеток...

Сведения об авторах

Ю.И. Пивоваров — д-р мед. наук, профессор, ведущий науч. сотрудник научного отдела коронарного атеросклероза НЦ РВХ СО РАМН (г. Иркутск).

Т.Е. Курильская — д-р мед. наук, зав. научным отделом коронарного атеросклероза НЦ РВХ СО РАМН (г. Иркутск).

А.С. Сергеева — канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник научного отдела коронарного атеросклероза НЦ РВХ СО РАМН (г. Иркутск).

И.В. Бабушкина — мл. науч. сотрудник научного отдела коронарного атеросклероза НЦ РВХ СО РАМН (г. Иркутск).

Б.К. Бадугев — науч. сотрудник лаборатории физиологической генетики Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск).

Г.Б. Боровский — д-р мед. наук, профессор, зам. директора по науке Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск).

Для корреспонденции

Сергеева Анна Сергеевна, тел.: 8-904-112-5551, 8 (39-52) 46-55-56; e-mail: sergeeva1111@yandex.ru