



УДК 616.36-092.96:612.123

Динамика объёма липидных капель клеток печени при экспериментальной дислиппротеидемии

Н. П. Судаков^{1,4,5}, И. В. Клименков^{2,4}, О. А. Гольдберг¹,
С. Б. Никифоров¹, С. А. Лепехова^{1,5}, Ю. М. Константинов^{3,4}

¹*Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии
СО РАМН, Иркутск*

²*Лимнологический институт СО РАН, Иркутск*

³*Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск*

⁴*Иркутский государственный университет, Иркутск*

⁵*Иркутский научный центр СО РАМН, Иркутск*

E-mail: npsudakov@rambler.ru

Аннотация. Изучена динамика объёма липидных капель клеток печени на разных сроках экспериментальной дислиппротеидемии (до 90 сут.) на кроликах породы шиншилла методом лазерной конфокальной микроскопии. Анализ препаратов печени, окрашенных DAPI (ядра) и Nile red (липидные капли) показал, что уже с первых недель атерогенной диеты объём липидных капель в клетках печени статистически значимо возрастает. Это создает основу для формирования структурно-функциональных нарушений других внутриклеточных органелл, что способствует прогрессированию дислиппротеидемии. Полученные результаты определяют перспективу использования лазерной конфокальной микроскопии для исследований биоптата печени с целью ранней диагностики её липидной инфильтрации.

Ключевые слова: дислиппротеидемия, жировая инфильтрация печени, липидные капли, лазерная конфокальная микроскопия.

Введение

Известно, что развитие жировой инфильтрации печени способствует нарушению регуляции обмена холестерина крови – дислиппротеидемии, являющейся основной причиной развития одного из самых распространённых социально-значимых заболеваний – атеросклероза [1; 6]. Современные представления о клеточных механизмах развития нарушений липидного обмена в печени не обладают целостностью, достаточной для создания эффективных технологий их ранней диагностики, профилактики и лечения. В настоящее время показано, что роль липидных капель в клетках не ограничивается накоплением липидов – установлена их активная роль как в нормальном функционировании клетки, так и в развитии её повреждений при избыточном накоплении первых [4]. Тем не менее при дислиппротеидемии не изучены количественные закономерности формирования липид-

ных капель, способных вызывать дисфункцию органелл в клетках печени. Решение данных вопросов будет служить основой для разработки новых технологий диагностики и прогнозирования структурно-функциональных нарушений печени при нарушениях липидного обмена крови, способствующих развитию атеросклероза.

Материалы и методы

В эксперименте использовали самцов кроликов породы шиншилла. Животные были разделены на две группы по 10 особей в каждой: модель дислипидотеидемии (ежедневная атерогенная диета: 350 мг холестерина на 1 кг веса животного в течение 90 сут.) и группа контроля (стандартная диета вивария). Изучали концентрацию общего холестерина, холестерина ЛПНП, ЛПОНП и ЛПВП крови на биохимическом анализаторе Beckman Synhron 4 (Beckman Coulter, США) с использованием наборов реагентов фирмы «Human GmbH» (Германия) согласно инструкции производителя. Индекс атерогенности рассчитывали по формуле Фридвальда [1]. Фрагменты ткани печени фиксировали 2%-ным параформальдегидом. Ядра клеток окрашивали DAPI (Sigma-Aldrich, США), липидные капли – Nile red (Sigma-Aldrich, США) [8]. Сканирование срезов печени осуществляли с помощью лазерного конфокального микроскопа LSM-710 (Carl Zeiss, Германия). Полученные при сканировании трёхмерные изображения обрабатывались математически в программной среде Imaris Bitplane 7.2.3. Оценивали общий объём липидных капель в $1 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ ткани печени. Все манипуляции с экспериментальными животными осуществлялись согласно правилам проведения работ с использованием животных в эксперименте (Минздрав СССР, приказ 12.07. 1977 г. № 755) и «Правилами проведения качественных клинических испытаний в Российской Федерации» (утверждены Минздравом РФ и введены в действие с 1 января 1999 г.). Статистический анализ полученных данных проводили с помощью пакета программ Statistica 10. Межгрупповые различия оценивали по критерию Манна – Уитни и считали статистически значимыми при $p_u \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Установлено, что у экспериментальных животных дисбаланс атерогенной (ЛПНП и ЛПОНП) и антиатерогенной (ЛПВП) фракций холестерина крови формируется уже на 2-е сут. моделирования дислипидотеидемии и характеризуется двукратным возрастанием индекса атерогенности ($p_u \leq 0,05$). К 7-м суткам наблюдения данный показатель увеличивается в сравнении с контролем в 6 раз ($p_u \leq 0,05$). На 30-е и 90-е сут. эксперимента данный показатель возрастает в 28 и 31 раз соответственно ($p_u \leq 0,05$), что отражает развитие выраженных нарушений обмена липидов крови. С помощью лазерной конфокальной микроскопии показано, что на фоне данных изменений липидного обмена крови в гепатоцитах на 7-е сут. экспериментальной дислипидотеидемии регистрируется статистически значимое ($p_u \leq 0,05$) трёхкратное возрастание общего объёма

липидных капель в сравнении с контролем (рис.). Зарегистрированная величина липидной инфильтрации в печени животных, получавших атерогенную диету, сохраняется и на 30-е сут. эксперимента. Можно предположить, что выявленное сохранение объёма липидных капель клеток печени с 7-х по 30-е сут. атерогенной диеты отражает сохранность механизмов, обеспечивающих резистентность печени к развитию липидной инфильтрации. К данным механизмам можно отнести повышенную экспрессию белка РАТ-1, активизирующего утилизацию жирных кислот, активизацию липофагии, повышение активности 7α -гидроксилазы – ключевого фермента метаболизма холестерина в желчные кислоты [1; 5; 7]. На 90-е сут. наблюдения объём липидных капель клеток печени возрастает в 19 раз ($p \leq 0,05$) по отношению к группе контроля, что отражает развитие выраженных нарушений липидного обмена в печени.

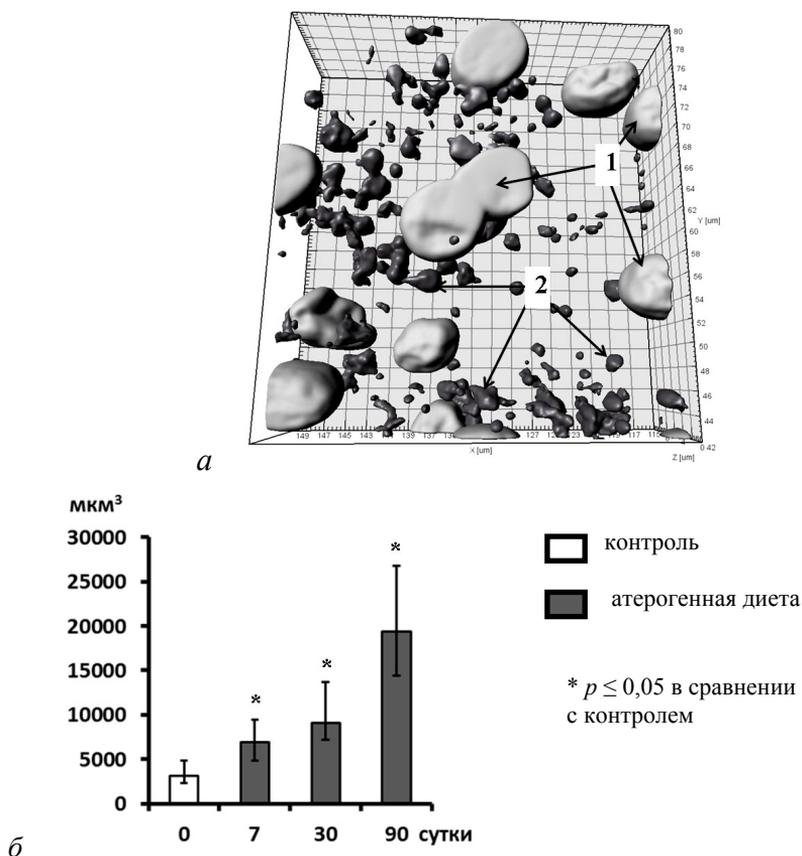


Рис. 1. Изменения общего объёма липидных капель в клетках печени при атерогенной диете: а – трёхмерная реконструкция фрагмента ткани печени при экспериментальной дислипидотеидемии (90 суток): 1 – ядра (DAPI); 2 – липидные капли (Nile red); б – динамика общего объёма липидных капель в $1 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$ ткани печени под влиянием атерогенной диеты

Наблюдаемое высокое содержание внутриклеточных липидных включений может приводить к возрастанию уровня продуктов перекисного окисления липидов, повреждающих органеллы клетки и, таким образом, способствующих прогрессированию функциональных нарушений печени. Ранее нами были охарактеризованы структурно-функциональные нарушения митохондрий клеток печени, формирующиеся на 135-е сут. атерогенной диеты. Данные нарушения проявляются изменением микрорельефа митохондриальных мембран, фрагментацией крист, набуханием митохондрий, а также снижением их дыхательной активности [2; 3]. По всей видимости, зарегистрированная митохондриальная дисфункция клеток печени при экспериментальной дислипидотеидемии является одним из последствий развития липидной инфильтрации данного органа.

Таким образом, метод лазерной конфокальной микроскопии позволяет уже в течение первых недель экспериментальной дислипидотеидемии выявить возрастание объёма липидных капель в клетках печени, что служит основой для формирования их структурно-функциональных нарушений. Это определяет перспективу использования данной технологии для исследований биоптата печени с целью ранней диагностики её липидной инфильтрации. Высокий интерес представляет изучение механизмов обратимости ранних этапов развития жировой инфильтрации печени при дислипидотеидемии, что будет способствовать созданию новых технологий лечения и профилактики данных патологических процессов.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» (проект ФНМ-15-2012), стипендии Президента РФ (проект СП-285.2012.4), гранта Carl Zeiss (проект Prospects of using confocal laser scanning microscopy of the diagnostics and prognosis of fatty liver disease associated with metabolic syndrome, 2013 г).

Список литературы

1. Климов А. Н. Обмен липидов, липопротеидов и его нарушения / А. Н. Климов, Н. Г. Никульчева. – СПб : Питер Ком, 1999. – 512 с.
2. Структурно-функциональные нарушения митохондрий печени при атеросклерозе в эксперименте / Н. П. Судаков [и др.] // Изв. Иркут. гос. ун-та. Сер. Биология. Экология. – 2008. – Т. 1, № 2. – С. 15–19.
3. Ультра- и наноструктурные нарушения митохондрий клеток печени при экспериментальной дислипидотеидемии / Н. П. Судаков [и др.] // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2010. – № 5. – С. 197–201.
4. Cell-to-cell heterogeneity in lipid droplets suggests a mechanism to reduce lipotoxicity / A. Herms [et al.] // Curr. Biol. – 2013. – Vol. 23. – P. 1489–1496.
5. Liu K. Regulation of lipid stores and metabolism by lipophagy. / K. Liu, M. J. Czaja // Cell Death Differ. – 2013. – Vol. 20. – P. 3–11.
6. Other aspects of bariatric surgery: liver steatosis, ferritin and cholesterol metabolism / A. E. Pontiroli [et al.] // Nutr. Hosp. – 2013. – Suppl. 2. – P. 104–108.
7. OXPAT/PAT-1 is a PPAR-induced lipid droplet protein that promotes fatty acidutilization. / N. E. Wolins [et al.] // Diabetes. – 2006. – Vol. 55. – P. 3418–3428.

8. The effect of simvastatin on lipid droplets accumulation in human embryonic kidney cells and pancreatic cancer cells. / H. Gbelcová [et al.] // *Lipids Health Dis.* – 2013. – Vol. 12. – P. 126.

Dynamics of Lipid Droplets Volume in Liver Cells at Experimental Dyslipoproteinemia

N. P. Sudakov^{1,4,5}, I. V. Klimenkov^{2,4}, O. A. Goldberg¹,
S. B. Nikiforov¹, S. A. Lepekhova^{1,5}, Yu. M. Konstantinov^{3,4}

¹*Scientific Center for Reconstructive and Restorative Surgery SB RAMS, Irkutsk*

²*Limnological Institute SB RAS, Irkutsk*

³*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk*

⁴*Irkutsk State University, Irkutsk*

⁵*Irkutsk Scientific Center, SB RAS, Irkutsk*

Abstract. The dynamics of lipid droplets volume in liver cells at different periods of experimental dyslipoproteinemia (to 90 days) were studied using Shinshilla rabbits by laser confocal microscopy. The analysis of liver preparations stained with DAPI (nuclei) and Nile red (lipid droplets) showed that as early as from the first weeks of experimental dyslipoproteinemia, the volume of lipid droplets significantly increases in liver cells. This makes the basis for the formation of structural and functional disturbances in the intracellular organelles that enhances dyslipoproteinemia. These results open the possibility of using confocal scanning microscopy for analysis of liver tissue samplings for early diagnostics of liver infiltrations with lipids.

Keywords: dyslipoproteinemia, lipid infiltration of the liver, lipid droplets, laser confocal microscopy.

Судаков Николай Петрович
кандидат биологических наук, доцент
старший научный сотрудник
Научный центр реконструктивной
и восстановительной хирургии СО РАМН
664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1
Иркутский государственный университет
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1
Иркутский научный центр СО РАН
664033, г. Иркутск ул. Лермонтова, 134
тел.: (3952) 29–03–39
e-mail: npsudakov@rambler.ru

Sudakov Nikolai Petrovich
Candidate of Sciences (Biology)
Associate Professor, Senior Research
Scientist
Scientific Center for Reconstructive and
Restorative Surgery SB RAMS
1, Bortsov Revolyutsii St., Irkutsk, 664003
Irkutsk State University
1, K. Marx st., Irkutsk, 664033
Irkutsk Scientific Center, SB RAS
134, Lermontovs St., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 29–03–39
e-mail: npsudakov@rambler.ru

Клименков Игорь Викторович
кандидат биологических наук, доцент
старший научный сотрудник
Лимнологический институт СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3

Klimenkov Igor Victorovich
Candidate of Sciences (Biology), Associate
Professor, Senior Research Scientist
Limnological Institute SB RAS
3, Ulan-Batorskaya st., Irkutsk, 664033

Иркутский государственный университет
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1
тел.: (395 2) 42–32–80
e-mail: iklimen@mail.ru

Irkutsk State University
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003
tel.: (395 2) 42–32–80
e-mail: iklimen@mail.ru

Гольдберг Олег Аронович
кандидат медицинских наук
ведущий научный сотрудник
Научный центр реконструктивной
и восстановительной хирургии СО РАМН
664003, г. Иркутск, ул. Борцов
Революции, 1
тел.: (3952) 29–03–39
e-mail: npsudakov@rambler.ru

Goldberg Oleg Aronovich
Candidate of Sciences (Medicine)
Leading Research Scientist
Scientific Center for Reconstructive
and Restorative Surgery SB RAMS
1, Bortsov Revolyutsii st., Irkutsk, 664003
tel.: (3952) 29–03–39
e-mail: npsudakov@rambler.ru

Никифоров Сергей Борисович
доктор медицинских наук
ведущий научный сотрудник
Научный центр реконструктивной
и восстановительной хирургии СО РАМН
664003, г. Иркутск, ул. Борцов
Революции, 1
тел.: (3952) 29–03–39
e-mail: telomer@mail.ru

Nikiforov Sergei Borisovich
Doctor of Sciences (Medicine)
Leading Research Scientist
Scientific Center for Reconstructive and
Restorative Surgery SB RAMS
1, Bortsov Revolyutsii st., Irkutsk, 664003
tel.: (3952) 29–03–39
e-mail: telomer@mail.ru

Лепехова Светлана Александровна
доктор биологических наук
заведующий отделом
Научный центр реконструктивной
и восстановительной хирургии СО РАМН
664003, г. Иркутск, ул. Борцов
Революции, 1
Иркутский научный центр СО РАМН
664033, г. Иркутск ул. Лермонтова, 134
тел.: (3952) 29–03–39
e-mail: lepekhova_sa@mail.ru

Lepekhova Svetlana Aleksandrovna
Doctor of Sciences (Biology)
Head of Department
Scientific Center for Reconstructive and
Restorative Surgery SB RAMS
1, Bortsov Revolyutsii st., Irkutsk, 664003
Irkutsk Scientific Center SB RAMS
134, Lermontovs st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 29–03–39
e-mail: lepekhova_sa@mail.ru

Константинов Юрий Михайлович
доктор биологических наук, профессор
заведующий лабораторией
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
Иркутский государственный университет
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1
тел.: (3952) 42–49–03
e-mail: yukon@sifibr.irk.ru

Konstantinov Yurii Mikhailovich
Doctor of Sciences (Biology), Professor
Head of Laboratory
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033
Irkutsk State University
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003
tel.: (3952) 42–49–03
e-mail: yukon@sifibr.irk.ru