

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МСК РАЗЛИЧНОЙ ОНТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ЗРЕЛОСТИ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ХРОНИЧЕСКОГО ФИБРОЗИРУЮЩЕГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ПЕЧЕНИ

Шагидулин М.Ю.^{1, 2}, Горкун А.А.³, Онищенко Н.А.^{1, 2}, Крашенинников М.Е.¹, Ильинский И.М.^{1, 2}, Можейко Н.П.¹, Башкина Л.В.¹, Сабурина И.Н.³, Севастьянов В.И.¹, Готье С.В.^{1, 2}

¹ ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России (директор – академик РАМН, проф. С.В. Готье), Москва, Российская Федерация

² Кафедра трансплантологии и искусственных органов (зав. – академик РАМН, проф. С.В. Готье) ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (ректор – член-корр. РАМН, проф. П.В. Глыбочко), Москва, Российская Федерация

³ ФГБУ НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН (директор – академик РАМН, проф. А.А. Кубатиев), Москва, Российская Федерация

Цель. Сравнить эффективность использования МСК (мезенхимальных стромальных клеток) различной онтогенетической зрелости (МСК костного мозга – МСК КМ и МСК пупочного канатика МСК ПК) на восстановительные процессы в поврежденной печени. **Материалы и методы.** В 4 группах опытов на крысах Вистар (n = 80) с моделью токсического фиброзирующего повреждения печени (ФПП) было изучено влияние МСК различной онтогенетической зрелости на процессы восстановительной регенерации: 1-я гр. – контроль; 2-я и 3-я гр. – введение МСК КМ в составе *Сферо*[®]ГЕЛЬ-лонг в дозах $2,5 \times 10^6$ и $5,0 \times 10^6$ клеток соответственно; 4-я гр. – введение МСК ПК в виде клеточных сфероидов ($8-10 \times 10^5$ клеток). Клетки вводили в печень через 7 суток после окончания моделирования ФПП и изучали эффект клеточной терапии в течение 180 суток. Об эффективности корригирующей терапии судили по результатам функционального и морфологического состояния печени (гистологический контроль паренхимы и непаренхиматозных тканей). **Результаты.** МСК КМ в обеих дозах и МСК ПК способствовали более быстрой нормализации печеночных ферментов по сравнению с контролем (1-я гр.); однако различия в скорости восстановления нарушенных энзиматических функций печени между группами 2, 3 и 4 отсутствовали. Через 90 суток после применения клеток установлена более выраженная регенераторная активность используемых клеток в 3-й и 4-й группах; через 180 суток более выраженная активация восстановительных процессов отмечена в 3-й группе; в 4-й группе на этом сроке оказались более выраженными процессы склерозирования. **Заключение.** Для индукции восстановительных процессов в печени целесообразно использовать не МСК ПК, а МСК КМ в составе *Сферо*[®]ГЕЛЬ, так как МСК КМ оказывают не только местное, но и системное иммунорегуляторное воздействие, увеличивая пул Т-регуляторных клеток, которые являются дополнительным переносчиком регенерационной информации в организме.

Ключевые слова: хроническое фиброзирующее повреждение печени, мезенхимальные стромальные клетки.

USING OF MSC WITH DIFFERENT ONTOGENETIC MATURITY FOR CORRECTION OF CHRONIC FIBROSING LIVER DAMAGE

Shagidulin M.Y.^{1, 2}, Gorkun A.A.³, Onishchenko N.A.^{1, 2}, Krasheninnikov M.E.¹, Iljinsky I.M.^{1, 2}, Mogeiko N.P.¹, Bashkina L.V.¹, Saburina I.N.³, Sevastjanov V.I.¹, Gautier S.V.^{1, 2}

¹ Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs (Head – academician of RAMSci, prof. S.V. Gautier), Moscow, Russian Federation

² Department of Transplantology and Artificial Organs I.M. Setchenov First Moscow State Medical University (rector – korresponding member of RAMSci, prof. P.V. Glybochko), Moscow, Russian Federation

³ The Institute of General Pathology and Pathophysiology RAMSci (Head – academician, prof. A.A. Kubatiev), Moscow, Russian Federation

Aim. To compare the effectiveness of MSC with different degree of ontogenetic maturity (MSC bone marrow – MSC BM and MSC umbilical cord – MSC UC) on regenerative processes in injured liver. **Methods.** In 4 groups of experiments on Wistar rats (n = 80) with a model of fibrotic toxic liver damage (FLD) it was studied the effect of MSCs with different degree of ontogenetic maturity on recovery processes at the regeneration of damaged liver: 1 gr. – Control, 2 gr. and 3 gr. introduction of MSC BM, included in Sphero®GEL-long in doses of 2.5×10^6 and 5.0×10^6 cells, respectively, and 4 gr. – introduction of MSC UC in the form of cell-spheroids ($8\text{--}10 \times 10^5$ cells). The cells were injected into the damaged liver in 7 days after the end of FDL-modeling. The effect of cell therapy was studied during 180 days. The effectiveness of corrective therapy was evaluated by the results of functional and morphological investigations of livers (histological control of parenchymal and nonparenchymal liver tissue). **Results.** MSC BM in both doses and MSC UC contributed to a more rapid normalization of liver enzyme indices compared with the control (1 gr.), but the differences in the rate of recovery of disturbed enzymatic liver functions between groups 2, 3 and 4 – were absent. In 90 days after the cell application it was determined a more pronounced recovery activity of cells in groups 3 and 4; in 180 days the more pronounced activation of recovery processes was observed in group 3; but in group 4 the sclerotic processes were more pronounced in this period. **Conclusion.** For the induction of recovery processes in damage liver it is advisable not to use the MSC UC, but to use MSC BM in the Sphero®GEL, because MSC BM exert not only local but also systemic immune-regulatory effect, increasing the pool of T-reg. cells, which are additional carriers of regeneration information in organism.

Key words: fibrotic liver damage, mesenchymal stromal cells.

Шагидулин Мурат Юнусович – к. м. н., заведующий отделом экспериментальной трансплантологии и искусственных органов ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава РФ (директор – академик РАМН, проф. С.В. Готье), Москва, Российская Федерация; доцент кафедры трансплантологии и искусственных органов (зав. – академик РАМН, проф. С.В. Готье) ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» (ректор – член-корр. РАМН, проф. П.В. Глыбочко). *Горкун Анастасия Алексеевна* – к. б. н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной биологии и патологии развития ФГБУ НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН (директор – академик РАМН, проф. А.А. Кубатиев), Москва, Российская Федерация. *Онищенко Нина Андреевна* – д. м. н., профессор, заведующая лабораторией биотехнологии стволовых клеток ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава РФ (директор – академик РАМН, проф. С.В. Готье); профессор кафедры трансплантологии и искусственных органов (зав. – академик РАМН, проф. С.В. Готье), ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (ректор – член-корр. РАМН, проф. П.В. Глыбочко), Москва, Российская Федерация. *Крашенинников Михаил Евгеньевич*, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии стволовых клеток того же центра. *Ильинский Игорь Михайлович* – д. м. н., профессор, заведующий отделом клинической патологии того же центра; профессор кафедры трансплантологии и искусственных органов (зав. – академик РАМН, проф. С.В. Готье) ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» (ректор – член-корр. РАМН, проф. П.В. Глыбочко), Москва, Российская Федерация. *Можейко Наталья Павловна* – к. м. н., врач патологоанатомического отделения того же центра. *Башкина Людмила Валентиновна* – к. м. н., старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии стволовых клеток того же центра. *Севастьянов Виктор Иванович* – д. б. н., профессор, заведующий отделом биомедицинских технологий и тканевой инженерии того же центра. *Готье Сергей Владимирович* – академик, д. м. н., профессор, директор того же центра; заведующий кафедрой трансплантологии и искусственных органов, ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (ректор – член-корр. РАМН, проф. П.В. Глыбочко), Москва, Российская Федерация. *Сабурин Ирина Николаевна* – д. б. н., заведующая лабораторией клеточной биологии и патологии развития ФГБУ НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН (директор – академик РАМН, проф. А.А. Кубатиев), Москва, Российская Федерация.

Для корреспонденции: Шагидулин Мурат Юнусович. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Телефон: 8 (499) 196-87-90; моб. 8 (915) 260-82-84. E-mail: dr.shagidulin@mail.ru.

Shagidulin Murat Yunusovich – cand. of med. sci., Head of experimental transplantology and artificial organs Department, Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs (Head – academician, prof. S.V. Gautier), Moscow, Russian Federation; chair of transplantology and artificial organs (Head – academician, prof. S.V. Gautier) I.M. Setchenov First Moscow state Medical University (rector – corresponding member prof. P.V. Glybochko), Moscow, Russian Federation. *Gorkun Anastasiya Alekseevna* – cand. of bio. sci., senior researcher fellow of Laboratory of Cell Biology and Pathology of Development The Institute of General Pathology and Pathophysiology RAMSci, Moscow, Russian Federation. *Onishchenko Nina Andreevna* – prof., Head of the Laboratory of biotechnology stem cells Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs (Head – academician, prof. S.V. Gautier), Moscow, Russian Federation; chair of transplantology and artificial organs (Head – academic, prof. S.V. Gautier) I.M. Setchenov First Moscow state Medical University (rector – corresponding member prof. P.V. Glybochko), Moscow, Russian Federation. *Krasheninnikov Mikhail Evgen'evich* – cand. of bio. sci., senior researcher of Stem Cells Laboratory Academician V.I. Shumakov federal research center of transplantology and artificial organs (Head – academician, prof. S.V. Gautier), Moscow, Russian Federation. *Ilyinsky Igor Mikhailovich* – professor, Head of Clinical Pathology Department at the same center; chair of transplantology and artificial organs (head – academician, prof. Gautier S.V.) I.M. Setchenov First Moscow state Medical University (rector – corresponding member prof. P.V. Glybochko). *Mozheiko Natalia Pavlovna* – cand. of med. sci., the doctor of Clinical Pathology Department at the same center.

ВВЕДЕНИЕ

Общеизвестно, что ткань печени обладает уникальной способностью к восстановительной регенерации, которая, однако утрачивается (ингибируется) при развитии тяжелого фиброзирующего процесса в ней. Методы регенеративной медицины предназначены восстанавливать сниженный регенерационный потенциал клеток печени как путем активации процессов дедифференцировки (т. е. омоложения) паренхиматозных клеток печени в очагах повреждения, так и путем активации функции регионарных стволовых клеток печени (овальные клетки, клетки Ито) и костного мозга, обеспечивая тем самым мобилизацию собственных стволовых ресурсов организма [1, 2] и дерепрессию генов, отвечающих за синтез тканеспецифических белков, клеточное деление и регенерацию.

По современным представлениям, стволовые прогениторные клетки костного мозга, в том числе содержащиеся в нем резидентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК), являются неизменными участниками восстановительного морфогенеза печени, так как непосредственно оказывают свое регенераторное воздействие на систему стволовых/прогениторных клеток печени [1, 3]. Существуют данные, что МСК, трансплантированные в печень реципиента, приобретают фенотип гепатоцитов [4–8], с трансплантацией МСК крысам в поврежденную печень отрицается возможность дифференцировки этих клеток в гепатоциты. В то же время было показано, что при введении МСК крысам на ранних стадиях фиброзирующего процесса в печени выраженность процессов дефиброзирования печени находится в прямой зависимости от используемой дозы МСК [9]. Эти данные позволили нам предположить, что предотвращения развития фиброзов в поврежденной печени можно достигнуть не только используя МСК в достаточной дозе, но и используя МСК с более высокой биорегуляторной активностью, которая может быть достигнута за счет снижения онтогенетической зрелости этих клеток, например при использовании МСК из пупочного канатика новорожденных. Для проверки этого предположения нами было предпринято настоящее исследование. Целью настоящего исследования явилось сравнительное изучение эффективности коррекции функциональных и структурных нару-

шений в поврежденной печени крыс при использовании МСК различной онтогенетической зрелости: из костного мозга взрослых крыс и из пупочного канатика новорожденного человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все манипуляции на животных проводились с 9 до 12 часов при комнатной температуре ($t = 22\text{--}24\text{ }^{\circ}\text{C}$), что исключало суточные колебания митотической активности клеток П. Работа выполнялась в соответствии с требованиями, изложенными в приказе МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г. и в приложении к приказу МЗ СССР № 565 от 04.10.1977 г.; а также в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» от 1973 г.; Санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) № 1045–73 от 1973 г. и постановлением правительства Москвы от 1 октября 2002 года № 819–ПП.

Опыты по моделированию хронического токсического фиброзирующего повреждения печени с переходом в цирроз (ФПП) проводили на крысах-самцах линии Вистар весом 250–260 г ($n = 100$) путем курсового введения CCl_4 на персиковом масле по модифицированной нами схеме в течение 6 недель [9]. После создания модели хронического фиброзирующего повреждения печени (ФПП) все животные были разделены на 4 группы в зависимости от типа и дозы МСК, примененной для коррекции печеночной недостаточности (ПН).

Для выделения и культивирования МСК из костного мозга (КМ) использовали крыс-самцов линии Август весом 150–170 г ($n = 20$). Приготовление культуры МСК КМ осуществляли по общепринятой методике, подробно описанной в наших публикациях [10, 11]. Выделенные клетки (жизнеспособность по окраске трипановым синим составила $94 \pm 2\%$) представляли собой первичную культуру, преимущественно мононуклеарных клеток КМ, которые затем высеивали в количестве 2,0–2,5 млн кл/мл в культуральные флаконы. Затем культуральные флаконы помещали в CO_2 -инкубатор с 5% концентрацией CO_2 и 95% содержанием атмосферного воздуха с повышенной влажностью. Через 2 суток после выделения первичной культуры неприкрепившую-

Bashkina Lydmila Valentinovna – cand. of med. sci., senior researcher of Stem Cells Laboratory at the same center. *Sevastianov Viktor Ivanovich* – professor, Head of the department of biomedical technologies and tissue engineering at the same center. *Gautier Sergey Vladimirovich* – academician, professor, Head at the same center. Head of transplantology and artificial organs chair I.M. Setchenov First Moscow state Medical University (rector – corresponding member prof. P.V. Glybochko), Moscow, Russian Federation. *Saburina Irina Nikolaevna* – Head of the Laboratory of Cell Biology and Pathology of Development The Institute of General Pathology and Pathophysiology RAMSci, Moscow, Russian Federation.

For correspondence: Shagidulin Murat Ynusovich. Address: 123182, Moscow, Schukinskaya str., 1. Phone: 8 (499) 196-87-90; mob. 8 (915) 260-82-84. E-mail: dr.shagidulin@mail.ru.

ся клеточную взвесь удаляли, а оставшиеся клетки с фибробластоподобной морфологией продолжали культивировать. Замену культуральной среды на свежую осуществляли каждые 3–4 суток. После образования 70% от конфлюэнтного монослоя клетки однократно отмывали раствором Версена, затем снимали раствором Версена с 0,25% трипсина, ресуспендировали в ростовой среде и разливали в новую культуральную посуду. Для эксперимента использовали клетки 1-го и 2-го пассажа. Общий срок культивирования клеточного материала составлял 10 суток.

Полученный материал представлял собой прикрепившиеся к пластику распластанные фибробластоподобные клетки (мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки) и считался пригодным для трансплантации, так как сохранял пролиферативную активность и не содержал погибших клеток.

Выделение и культивирование МСК из пупочного канатика (ПК) осуществляли путем механического измельчения фрагментов ПК методом ферментативной дезагрегации в 0,075% растворе коллагеназ I и IV типа. Культивирование проводили в стандартных условиях (37 °C; 5% CO₂) в полной ростовой среде DMEM/F12 (1:1) с добавлением 2 mM L-глутамина, 50 мкг/мл гентамицина, 1% ИТС (инсулин трансферин селенит натрия) и 10% FCS (замену среды производили каждые 2 суток) и высевали на чашки Петри в концентрации 50×10^3 кл/см². Культуры пассировали с использованием 0,25% раствора трипсина в плотности 50 тыс. кл/см². Плотность монослоя культуры клеток контролировали под микроскопом СКХ41 (Olimpus, Япония), фоторегистрацию осуществляли с помощью цифровой камеры DP300 (Olimpus, Япония). При каждом пассаже производили подсчет клеток с использованием автоматического счетчика клеток Countess (Invitrogen, США). На четвертом пассаже клеток клонированной культуры МСК ПК в полную ростовую среду добавляли VEGF (10 нг/мл) – фактор роста эндотелия сосудов и через 7 суток инкубации МСК ПК переводили в 3-D условия, что достигалось культивированием в системе «висячая капля». Для получения «висячих капель» из полученной суспензии на крышку чашки Петри наносили капли объемом 30 мкл, около 100 капель на одну крышку, для предотвращения испарения в чашку добавляли 5–6 мл ростовую среду DMEM/F12 (1:1) с добавлением 2 mM L-глутамина и 50 мкг/мл гентамицина. Клетки культивировали в системе «висячая капля» в стандартных условиях (37 °C; 5% CO₂) в течение 5–7 суток в количестве более 2 тыс. кл. в «висячей капле».

Клеточную терапию во всех 4 группах опытов проводили на 7-е сутки после завершения модели-

рования хронического ФПП. Крыс оперировали при анестезии Zoletil-100 из расчета 5 мг на 100 г веса.

В 1-й контрольной группе после окончания моделирования хронического ФПП в печень вводили физиологический раствор в количестве 650 мкл. Во 2-й и 3-й группах применяли МСК КМ, смешанные с гетерогенным биосовместимым и биodeградируемым гелем «Сферо®ГЕЛЬ-лонг» (0,65 мл) и такую клеточно-инженерную конструкцию (КИК) дробно вводили (в количестве 250 мкл) в паренхиму поврежденной печени крыс: во 2-й группе в дозе $2,5 \times 10^6$ клеток, а в 3-й группе – в дозе $5,0 \times 10^6$ клеток. Сферо®ГЕЛЬ-лонг (ЗАО «БИОМИР сервис», Москва) представляет собой гетерогенный имплантируемый гель со средним размером микрочастиц ~ 150 мкм, набухаемостью – не менее 87%, pH = 4,8–7,2 и временем биорезорбции Сферо®ГЕЛЯ до 1 года. Гель «Сферо®ГЕЛЬ-лонг» использовали для удержания МСК КМ в печени в едином объеме и для защиты аллогенных клеток от иммунного повреждения. В 4-й группе в поврежденную печень крыс вводили клеточные сфероиды диаметром 100–150 мкм, сформированные из 5 дневных культур МСК пупочного канатика человека в количестве 400 сфероидов ($8–10 \times 10^5$ клеток) без какой-либо защиты их от иммунного повреждения.

Специальную иммуносупрессивную терапию в этих опытах не проводили.

Эффективность коррекции клинических и структурных изменений в печени после моделирования хронического ФПП и трансплантации МСК КМ и МСК ПК в печень изучали через 30, 90 и 180 суток после их введения.

В крови животных измеряли динамику редукции ферментов цитолиза – АлАТ, АсАТ, щелочной фосфатазы с помощью тест-полосок Reflotron™ на биохимическом анализаторе Reflotron™ («Roche», Швейцария). Гистологические исследования ткани печени и зон трансплантации в нее клеточно-инженерной конструкции проводили путем окрашивания срезов печени гематоксилином и эозином, а также по Массону, Маллори и Ван Гизону. О степени индукции регенеративных процессов в организме при использовании МСК КМ и МСК ПК судили по результатам измерения содержания Т-регуляторных клеток (FoxP³) мононуклеарной фракции клеток периферической крови на разных сроках применения клеточной терапии. Мононуклеарную фракцию клеток получали методом градиентного центрифугирования на Ficoll-Paque. Исследование проводили на цитофлуориметре FC-500 фирмы Beckman – Coulter, с использованием моноклональных антител фирмы «e-Bioscience» к крысиным антигенам CD4, CD25 и FoxP³ клеток крысы, меченных флуорохромами PE, Fitc и PE-Cy5 соответственно.

Морфометрический анализ осуществляли с помощью программы ImageJ.

Статистические различия в результатах биохимического исследования крови в исследуемых группах оценивали по критерию t-Стьюдента. Выявленные различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Летальность крыс во время затравки составила 20%, что свидетельствовало о выборе эффективной схемы применения CCl_4 для моделирования токсического цирроза.

После завершения моделирования хронической печеночной недостаточности было выявлено повышение уровня ферментов цитолиза – гипертрансферазия: АлАТ и АсАТ повышалось в 3–4,5 раза, а щелочной фосфатазы (ЩФ) – в 5 раз во всех группах опытов (рис. 1); в дальнейшем в опытах без применения клеточной терапии (1-я контрольная группа животных) к концу 1-го месяца эти показатели снижались, но оставались на повышенном уровне по сравнению с интактными животными более 3 месяцев. В то же время при использовании клеточно-инженерных конструкций (МСК КМ в «Сферо®ГЕЛЬ-лонг») (гр. 2; 3) и МСК ПК в сфероидах (гр. 4), использованных для коррекции ХПН, цитолитический синдром был также выявлен, однако показатели цитолиза в этих экспериментальных группах и на всех сроках были достоверно ниже, чем в контрольной группе (рис. 1), и на всех сроках достоверно не различались между собой.

Функциональная компенсация, развивающаяся без и на фоне применения клеточной терапии, еще, однако, указывала на отсутствие структурных нарушений в печени. Действительно, спустя 30 суток после окончания затравки в контрольной группе (гр. 1) отмечались тяжелые структурные нарушения в печени: на фоне изменения балочного строения печеночных долек в печени отмечались выраженный полиморфизм паренхиматозных клеток, жировая дистрофия гепатоцитов, проявляющаяся появлением в большом количестве гепатоцитов с дегенерирующими ядрами и с внутриядерными липидными включениями на фоне достоверного снижения количества двухядерных гепатоцитов (табл. 1). Указанные изменения в структуре паренхиматозных клеток в контрольной группе (гр. 1) достоверно сохранялись в течение 90 и 180 суток после окончания затравки животных по сравнению с интактными животными (табл. 1). Структурные изменения в печени животных контрольной группы не ограничивались деструкцией паренхиматозных клеток. Уже на ранних сроках после моделирования ПН (на 30 сутки) наступала цирротическая трансформация деструктивных изменений в печени, при-

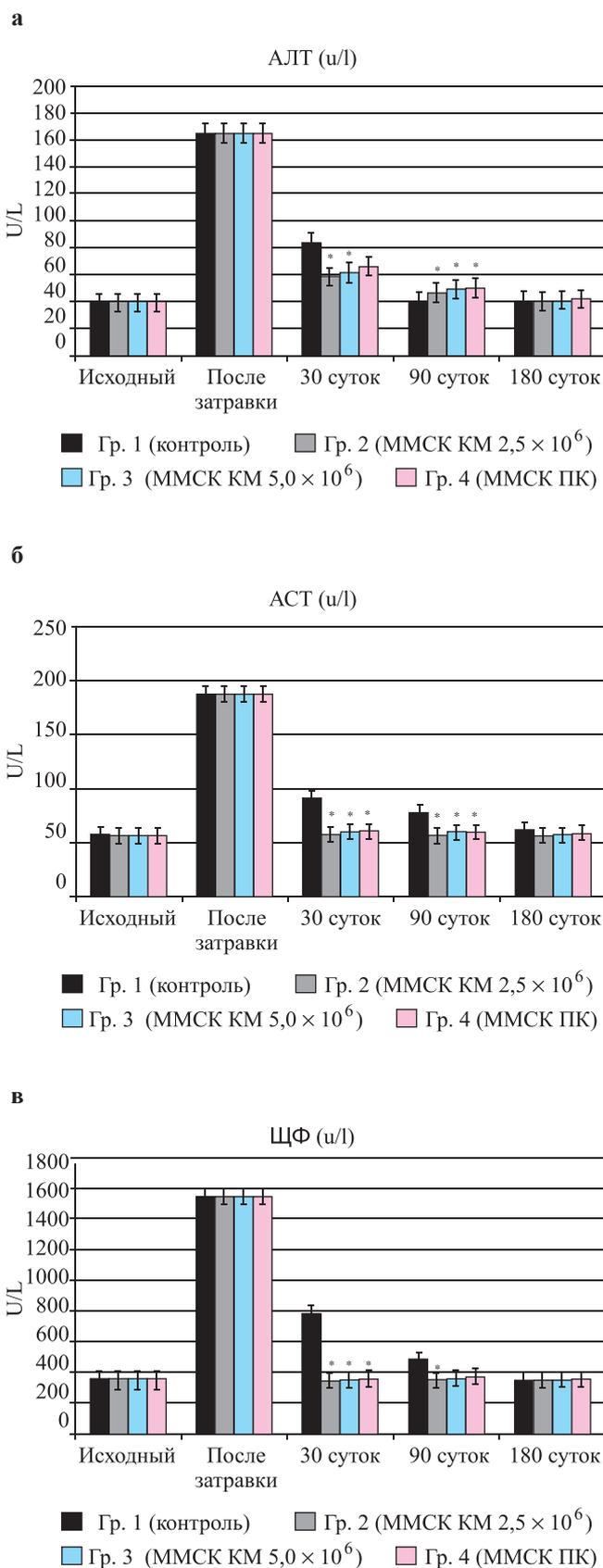


Рис. 1. Динамика восстановления уровня ферментов цитолиза в крови животных на различных сроках после моделирования (гр. 1 – контроль) и лечения хронической ПН (гр. 2; 3; 4): а – АЛТ (N до 40 ЕД); б – АСТ (N до 60 ЕД) и в – щелочной фосфатазы (N до 350 ЕД). * – различие достоверно по сравнению с контролем (гр. 1), $p < 0,05$

чем возникшие нарушения прогрессировали к 60, 90 и 180-м суткам после окончания затравки за счет разрастания соединительной ткани и формирования внутридолькового фиброза (табл. 2, рис. 2, а и 3, а).

В работах ряда авторов [12–16] показано, что МСК при введении в организм способны активизировать тканевые металлопротеиназы и их фибролиз-

тическую активность и тем самым способствовать активизации процессов дефибрирования поврежденных тканей.

Наши исследования подтвердили, что внутрипеченочное введение как МСК КМ (гр. 2 и 3), так и МСК ПК (гр. 4) снижают выраженность процессов фиброобразования в печени после моделирования на

Таблица 1

Гистологическая характеристика гепатоцитов печени крыс после моделирования хронического токсического повреждения без (гр. 1) и на фоне трансплантации клеточно-инженерных конструкций (КИК), состоящих из МСК КМ на матриксе «Сферо®ГЕЛЬ-лонг» (2-я и 3-я гр.) и сфероидов МСК ПК (гр. 4)

Показатели, %	N Интактная печень (норма)	Токсическое повреждение печени	Контроль гр. 1 (CCL4 + физ. р-р) n = 20			Гр. 2 (CCL4 + TX МСК КМ 2,5 млн) n = 20		Гр. 3 (CCL4 + TX МСК КМ 5,0 млн) n = 20		Гр. 4 (CCL4 + TX МСК ПК) n = 20	
			Срок после введения физ. р-ра, сут			Срок после TX КИК, сут		Срок после TX КИК, сут		Срок после TX сфероидов, сут	
			30	90	180	90	180	90	180	90	180
Гепатоциты с признаками жировой дистрофии	8 ± 1	* 782 ± 81	* 372 ± 3,5	* 25 ± 7,0	* 18 ± 8,0	* 18 ± 6,8	* 15 ± 7,2	* 7,0 ± 2,1	# 8,1 ± 2,7	*** 5,4 ± 1,3	** 24,3 ± 3,5
Гепатоциты с дегенерирующими ядрами	1,3 ± 0,3	* 322 ± 31	* 131 ± 18	* 15 ± 3,2	* 5,0 ± 1,1	*# 0,9 ± 0,4	* 1,6 ± 0,5	*** 0,9 ± 0,12	** 1,5 ± 0,21	*** 0,7 ± 0,4	** 1,5 ± 0,12
Количество двуядерных гепатоцитов	54,8 ± 7,2	* 32,2 ± 5,1	* 29,2 ± 2,6	* 41,6 ± 3,7	* 45 ± 5,0	* 42,1 ± 4,1	* 48 ± 6,0	** 47,1 ± 6,0	** 52,03 ± 7,0	** 37,8 ± 3,5	** 38,3 ± 3,4
Гепатоциты с внутриядерными липидными включениями	–	* 3 ± 0,5	* 15,0 ± 1,8	* 3,5 ± 0,4	* 1,8 ± 0,3	–	–	–	–	–	–

Примечание. * – p < 0,05 по сравнению с нормой; ** – p < 0,05 по сравнению с 30-ми сутками в контрольной группе; # – p < 0,05 по сравнению с 90-ми сутками в контрольной группе.

Таблица 2

Результаты морфометрического измерения площади соединительной ткани, кровеносных сосудов и желчных протоков после моделирования хронического токсического повреждения без (гр. 1) и на фоне трансплантации в печень клеточно-инженерных конструкций (КИК), состоящих из МСК КМ на матриксе «Сферо®ГЕЛЬ-лонг» (2-я и 3-я группы) и сфероидов МСК ПК (гр. 4) и сфероидов МСК ПК (4-я группа)

Показатели, %	N Интактная печень (норма)	Контроль гр. 1 (CCL4 + физ. р-р) n = 20			Гр. 2 (CCL4 + TX МСК КМ, 2,5 млн) n = 20		Гр. 3 (CCL4 + TX МСК КМ, 5,0 млн) n = 20		Гр. 4 (CCL4 + TX МСК ПК) n = 20	
		Срок после введения физ. р-ра, сут			Срок после TX КИК, сут		Срок после TX КИК, сут		Срок после TX, сут	
		30	90	180	90	180	90	180	90	180
Площадь соединительной ткани	1,5 ± 0,2	2,1 ± 0,8	** 5,6 ± 2,7	** 16,3 ± 3,5	2,2 ± 0,5	** 4,8 ± 1,2	*** 1,0 ± 0,3	*** 4,3 ± 1,5	*** 1,2 ± 0,3	*** 8,2 ± 2,14
Площадь кровеносных сосудов	2,7 ± 0,7	4,1 ± 1,2	** 8,7 ± 1,2	** 9,5 ± 2,0	** 10,1 ± 3,8	** 13,4 ± 4,1	** 12,3 ± 4,4	** 14,5 ± 4,2	** 10,0 ± 4,2	** 11,7 ± 3,3
Площадь желчных протоков	1,8 ± 0,8	2,7 ± 0,5	3,6 ± 0,7	** 6,7 ± 3,6	** 4,6 ± 1,1	** 7,0 ± 2,2	** 5,3 ± 0,3	** 7,8 ± 1,3	** 5,4 ± 0,2	** 6,3 ± 4,3

Примечание. ** – p < 0,05 по сравнению с 30-ми сутками в контрольной группе; # – p < 0,05 по сравнению с аналогичным сроком контрольной группы.

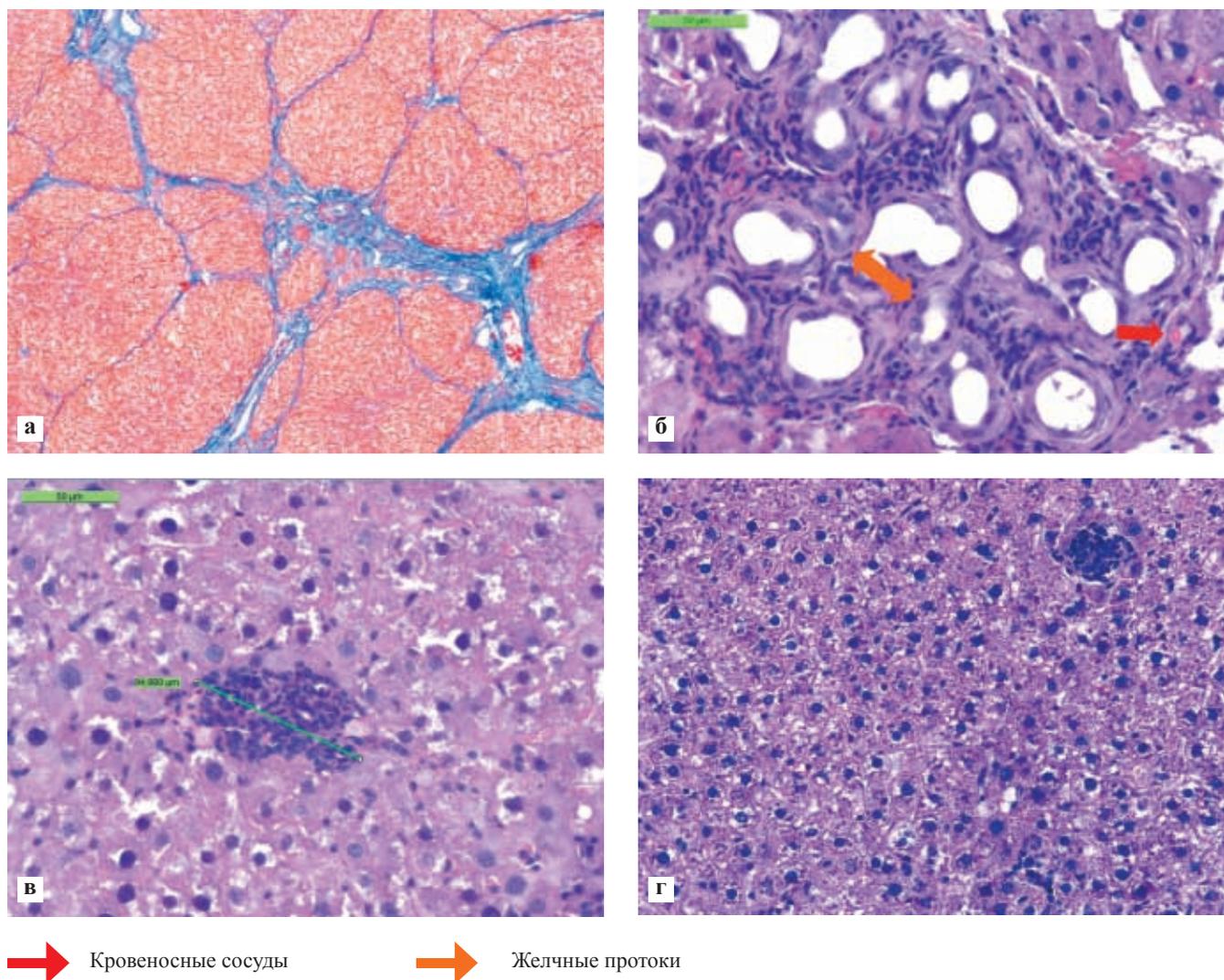


Рис. 2. Гистологическая картина печеночной ткани спустя 90 суток после моделирования ФПП: а – контроль – 1-я гр. Ложные дольки. Окраска по Маллори. $\times 100$; б – 3-я гр. Трансплантация МСК КМ в дозе 5 млн. Образование кровеносных сосудов и желчных протоков в зоне клеточно-инженерной конструкции. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$; в – 3-я гр. Трансплантация МСК КМ в дозе 5 млн. В паренхиме печени округлые образования, состоящие из МСК КМ, желчных протоков и сосудов. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$; г – 4-я гр. Трансплантация МСК ПК. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 200$

крысах хронического ФПП по сравнению с контролем (табл. 2). Обращает на себя внимание тот факт, что процессы дефиброзирования поврежденной печени были достоверно более выражены на 90-е сутки наблюдения в группе 3 и 4, по сравнению с аналогичным сроком в контрольной группе (табл. 2). На этом сроке в указанных группах нами отмечена также тенденция к увеличению кровенаполнения ткани печени и площади желчных протоков в ней (табл. 2). На рис. 1, б и в видно, что на 90-е сутки наблюдения в зонах трансплантации ткане-инженерных конструкций, состоящих из МСК КМ (3-я группа), а также в паренхиме печени этих животных происходит образование новых кровеносных сосудов и желчных протоков в зонах скопления МСК КМ. В группах 2, 3 и 4 на 90-е сутки наблюдения отмечено также улучшение гистологических

характеристик гепатоцитов в печени по сравнению с контролем (1-я группа) (табл. 1, рис. 2, в и г). При продолжении динамических исследований состояния печени на более отдаленных сроках после моделирования ФПП нами было отмечено, что в контрольной 1-й группе к 180-м суткам наблюдения процессы деструкции в паренхиме печени медленно нивелировались (табл. 1), тогда как площадь непаринхиматозных структур (площадь соединительной ткани, кровеносных сосудов и желчных протоков) к 180-м суткам достоверно увеличивалась (табл. 2 и рис. 3, а). При анализе результатов терапии МСК КМ (гр. 2 и 3) и МСК ПК (гр. 4) на 180-е сутки наблюдения было установлено, что в этих группах процессы деструкции гепатоцитов и непаринхиматозных тканей постепенно нивелируются, причем восстановительные процессы в этих группах более

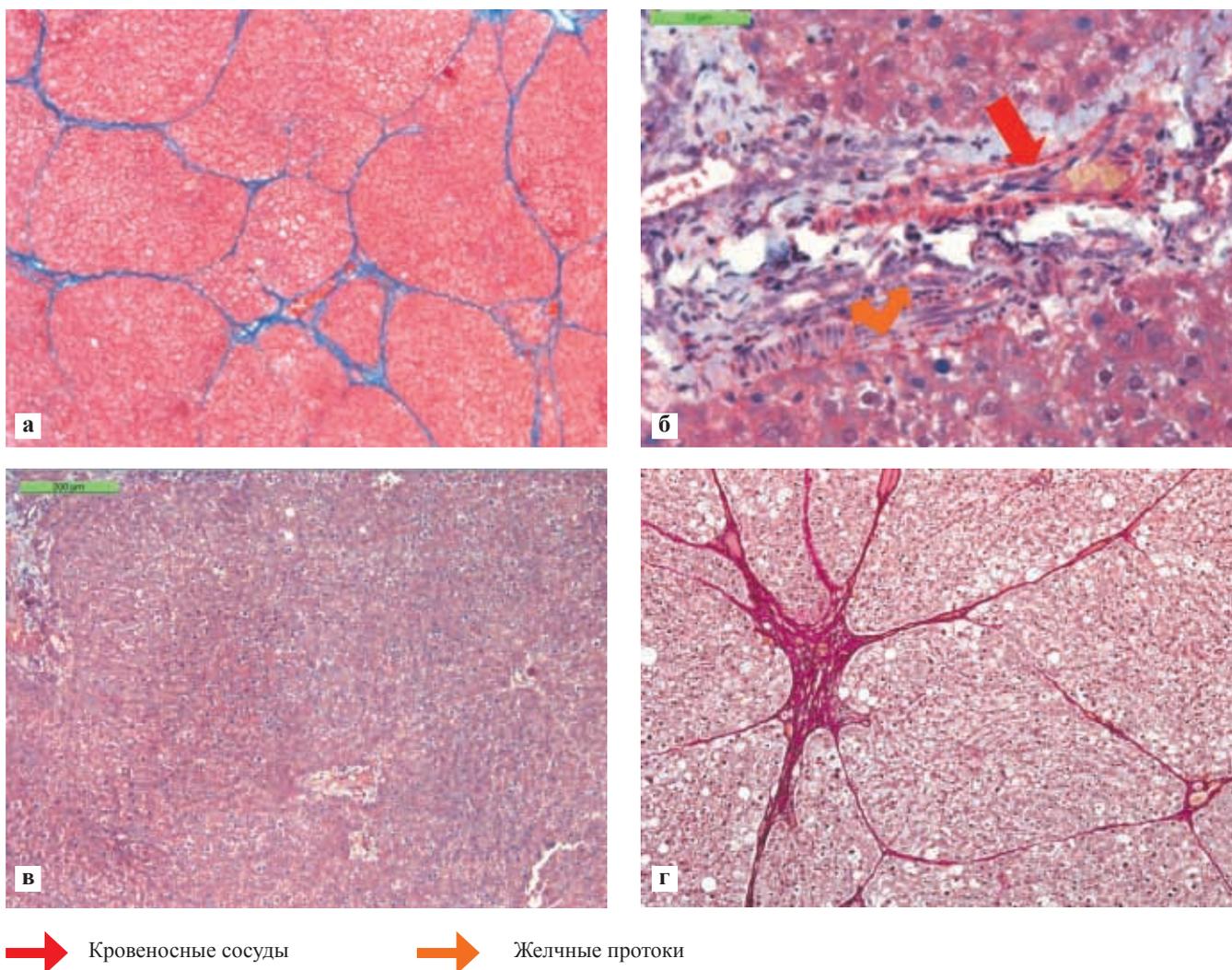


Рис. 3. Гистологическая картина печеночной ткани спустя 180 суток после моделирования ПН: а – контроль – 1-я гр. Цирроз печени. Окраска на соединительную ткань по Маллори. $\times 100$; б – 3-я гр. Новообразованные желчные протоки и сосуды в зоне введения клеточно-инженерной конструкции. Окраска по Массону. $\times 400$; в – 3-я гр. Очаговая умеренная дистрофия гепатоцитов после имплантации клеточно-инженерной конструкции. Окраска по Массону. $\times 100$; г – 4-я гр. Образование соединительной ткани после трансплантации клеточных сфероидов МСК ПК. Окраска по Ван Гизону. $\times 100$

выражены по сравнению с контролем (табл. 1 и 2). Однако при сравнении результатов измерения показателей в 3-й и 4-й группах можно отметить, что восстановительные процессы в паренхиме печени (количество гепатоцитов с признаками жировой дистрофии, количество двуядерных гепатоцитов) и в непаренхиматозных тканях печени (площадь соединительной ткани, кровеносных сосудов и желчных протоков) происходят более интенсивно при использовании для клеточной терапии не МСК ПК, а МСК КМ в более высокой дозе – 5,0 млн клеток (табл. 1 и 2). Иллюстрацией этого положения могут служить рис. 3, в, г. Ни в одном из опытов с применением МСК КМ нами не было отмечено интенсивного разрастания соединительной ткани, а в зонах трансплантации клеточно-инженерных конструкций нами отмечены новообразованные желчные протоки и кровеносные сосуды (рис. 2, б, 3, б).

Результаты применения МСК ПК на сроке 180 суток оказались для нас неожиданными, так как мы полагали, что клетки ПК, которые имеют меньшую онтогенетическую зрелость, должны более активно перепрограммировать и индуцировать восстановительные процессы в поврежденных органах. Можно полагать, что увеличение площади новообразованной соединительной ткани в печени при использовании МСК ПК на отдаленных сроках обусловлено их более выраженной способностью индуцировать восстановительные процессы, а не способностью их перепрограммировать, и это может быть обусловлено их менее выраженными стволовыми свойствами и отсутствием какого-либо иммунзащитного барьера (МСК ПК не были заключены в «Сферо®ГЕЛЬ»).

Как всякий регенераторный процесс, восстановление структуры ткани поврежденной печени

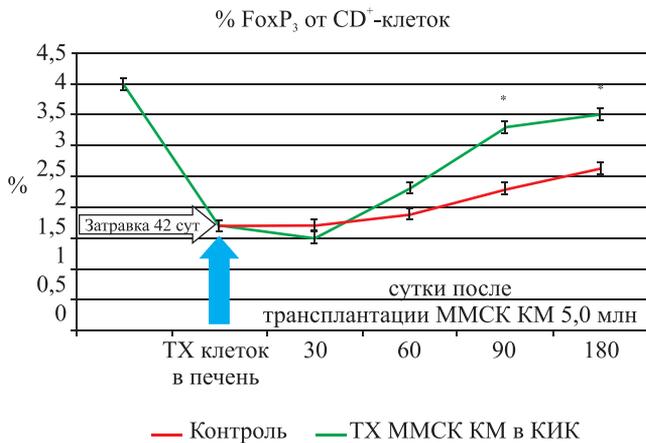


Рис. 4. Динамика содержания FoxP₃ клеток после затравки CCl₄ и введения МСК КМ в дозе 5,0 млн клеток

должен сопровождаться длительной активацией иммунитета, но не воспалительного, а ее регуляторного звена. В опытах с динамической регистрацией процентного содержания Т-регуляторных клеток (измерение FoxP₃ от CD⁴-Т-клеток) мы подтвердили, что моделирование ПН сопровождалось не только процессами деструкции, но и снижением уровня Т-рег. клеток; активация восстановительных процессов при введении МСК КМ сопровождалась повышением уровня в крови популяции Т-рег. клеток (рис. 4). Если исходить из того, что МСК были получены из костного мозга, который является главным органом иммуногенеза в организме, то нельзя исключить, что более высокий уровень восстановительных процессов в поврежденной печени обусловлен также дополнительной системной активацией клеток костного мозга, иммунные клетки которого (лимфоцитов) становятся более активными переносчиками регенерационной информации в орган [17].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Опыты с моделированием ПН и применением МСК различной онтогенетической зрелости для коррекции функциональных и структурных нарушений в печени показали, что МСК КМ и МСК ПК в течение 90 суток одинаково индуцируют восстановительные процессы в паренхиме и непаренхиматозных тканях печени. На более отдаленных сроках (180 суток) регуляторный потенциал МСК КМ более выражен, чем у МСК ПК, применение которых не препятствует развитию процессов фиброобразования печени на отдаленных сроках.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Онищенко Н.А., Люндуп А.В., Шагидулин М.Ю., Крашенинников М.Е. Синусоидальные клетки печени и

клеток костного мозга как компоненты единой функциональной системы регуляции восстановительного морфогенеза в здоровой и поврежденной печени. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2011; VI (2): 73–87.

2. Кухарчук А.Л. Стволовые клетки и регенеративно-пластическая медицина. *Трансплантология*. 2004; 7 (3): 76–90.
3. Люндуп А.В., Онищенко Н.А., Шагидулин М.Ю., Крашенинников М.Е. Стволовые/прогениторные клетки печени и костного мозга как регуляторы восстановительной регенерации поврежденной печени. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2010; XII (2): 100–107.
4. Fang B., Shi M., Liao L., Yang S., Liu Y., Zhao R.C. Systemic infusion of FLK1+ mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Transplant*. 2004; 78: 83–88.
5. Черных Е.Р., Останин А.А., Пальцев А.И. Стволовые клетки в регенерации печени: новые подходы к лечению печеночной недостаточности. *Гепатология*. 2004; 5: 24–33.
6. Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L., Schwartz R.E., Keene C.D., Ortiz-Gonzalez X.R., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low W.C., Largaespada D.A., Verfaillie C.M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002; 418: 41–49.
7. Schwartz R.E., Reyes M., Koodie J., Jiang Y., Blackstad M., Lund T., Lenvik T., Johnson S., Hu W.S., Verfaillie C.M. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J. Clin. Invest*. 2002; 109: 1291–1302.
8. Terada N., Hamazaki T., Oka M., Hoki M., Mastalerz D.M., Nakano Y., Meyer E.M., Morel L., Petersen B.E., Scott E.W. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*. 2002; 416: 542–545.
9. Онищенко Н.А., Люндуп А.В., Газизов И.М., Деев Р.В., Шагидулин М.Ю., Крашенинников М.Е., Аврамов П.В. Двухфазная динамика воздействия мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток (ММСК) костного мозга на печень при моделировании фиброзирующего гепатита. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2011; XIII (3): 51–58.
10. Шумаков В.И., Крашенинников М.Е., Онищенко Н.А., Быстров В.А., Бриль А.Г., Абалмасов К.Г. Культура клеток, содержащая клетки-предшественники остеогенеза, имплантант на ее основе и его использование для восстановления целостности кости. Патент № 2240135. 20.11. 2004 г.
11. Готье С.В., Шагидулин М.Ю., Онищенко Н.А., Крашенинников М.Е., Севастьянов В.И. Способ и трансплантат для лечения печеночной недостаточности. Патент № 2010110063/14 (014141). 03.03.2011.
12. Dai L.J., Li H.Y., Guan L.X., Ritchie G., Zhou J.X. The therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on hepatic cirrhosis. *Stem Cell Res*. 2009; 2 (1): 16–25.
13. Terai S., Ishikawa T., Omori K., Aoyama K., Marumoto Y., Urata Y., Yokoyama Y., Uchida K., Yamasaki T.,

- Fujii Y., Okita K., Sakaida I.* Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells*. 2006; 24 (10): 2292–2298.
14. *Киясов А.П., Одинцова А.Х., Гумерова А.А., Газизов И.М., Фаррахов А.З., Кундакчян Г.Г., Абдулхаков С.Р., Черемина Н.А., Йылмаз Т.С.* Трансплантация аутогенных гемопоэтических стволовых клеток больным хроническими гепатитами. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2008; 3 (1): 70–75.
 15. *Gasbarrini A., Rapaccini G.L., Rutella S., Zocco M.A., Tittoto P., Leone G., Pola P., Gasbarrini G., Di Campi C.* Rescue therapy by portal infusion of autologous stem cells in a case of drug-induced hepatitis. *Dig. Liver Dis*. 2007; 39: 878–882.
 16. *Esch J.S. 2nd, Knoefel W.T., Klein M., Ghodsizad A., Fuerst G., Poll L.W., Piechaczek C., Burchardt E.R., Feifel N., Stoldt V., Stockschröder M., Stoecklein N., Tustas R.Y., Eisenberger C.F., Peiper M., Häussinger D., Hosch S.B.* Portal application of autologous CD133⁺ bone marrow cells to the liver: a novel concept to support hepatic regeneration. *Stem Cells*. 2005; 23: 463–470.
 17. *Шумаков В.И., Онищенко Н.А.* Биологические резервы клеток костного мозга и коррекция органных дисфункций. Монография. М.: Лавр, 2009: 307.
 7. *Schwartz R.E., Reyes M., Koodie J., Jiang Y., Blackstad M., Lund T., Lenvik T., Johnson S., Hu W.S., Verfaillie C.M.* Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J. Clin. Invest*. 2002; 109: 1291–1302.
 8. *Terada N., Hamazaki T., Oka M., Hoki M., Matalerz D.M., Nakano Y., Meyer E.M., Morel L., Petersen B.E., Scott E.W.* Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*. 2002; 416: 542–545.
 9. *Onishchenko N.A., Lyundup A.V., Gazizov I.M., Deev R.V., Shagidulin M.Y., Avramov P.V.* Two-phase dynamics of fibrolytic effect of bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells (MSC) in chronic fibrotic liver damage. *Vestnik transplantologii i iskusstvennyh organov*. 2011; XIII (3): 51–58 (in rus).
 10. *Shumakov V.I., Krashennikov M.E., Onishchenko N.A., Bystrov V.A., Brill A.G., Abalmasov K.G.* Cell culture, comprising osteogenic precursor cells, the implant based on it and use it to restore the integrity of the bone. Patent number 2240135. from 20.11.2004 (in rus).
 11. *Gautier S.V., Shagidulin M.Y., Onishchenko N.A., Krashennikov M.E., Sevastyanov V.I.* The method and graft for treating hepatic insufficiency. Patent number 2010110063/14 (014141). from 03.03.2011 (in rus).
 12. *Dai L.J., Li H.Y., Guan L.X., Ritchie G., Zhou J.X.* The therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on hepatic cirrhosis. *Stem Cell Res*. 2009; 2 (1): 16–25.
 13. *Terai S., Ishikawa T., Omori K., Aoyama K., Marumoto Y., Urata Y., Yokoyama Y., Uchida K., Yamasaki T., Fujii Y., Okita K., Sakaida I.* Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells*. 2006; 24 (10): 2292–2298.
 14. *Kiyasov A.P., Odintsov A.H., Gumerova A.A., Gazizov I.M., Farrahov A.Z., Kundakchyan G.G., Abdulkhakov S.R., Cheremina N.A., Yilmaz T.S.* Transplantation of autologous hematopoietic stem cell patients with chronic hepatitis. *Klet. transpl. and tkan. inzheneriya*. 2008; 3 (1): 70–75 (in rus).
 15. *Gasbarrini A., Rapaccini G.L., Rutella S., Zocco M.A., Tittoto P., Leone G., Pola P., Gasbarrini G., Di Campi C.* Rescue therapy by portal infusion of autologous stem cells in a case of drug-induced hepatitis. *Dig. Liver Dis*. 2007; 39: 878–882.
 16. *Esch J.S. 2nd, Knoefel W.T., Klein M., Ghodsizad A., Fuerst G., Poll L.W., Piechaczek C., Burchardt E.R., Feifel N., Stoldt V., Stockschröder M., Stoecklein N., Tustas R.Y., Eisenberger C.F., Peiper M., Häussinger D., Hosch S.B.* Portal application of autologous CD133⁺ bone marrow cells to the liver: a novel concept to support hepatic regeneration. *Stem Cells*. 2005; 23: 463–470.
 17. *Shumakov V.I., Onishchenko N.A.* Biological reserves of bone marrow cells and correction of organ dysfunctions. Монография. М.: Лавр, 2009: 307 (in rus).

REFERENCES