

ДВУХФАЗНАЯ ДИНАМИКА ВОЗДЕЙСТВИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК (ММСК) КОСТНОГО МОЗГА НА ПЕЧЕНЬ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ФИБРОЗИРУЮЩЕГО ГЕПАТИТА

Онищенко Н.А.¹, Люндуп А.В.¹, Газизов И.М.², Деев Р.В.³, Шагидулин М.Ю.¹, Крашенинников М.Е.¹, Аврамов П.В.¹

¹ ФГУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития РФ, Москва

² Казанский государственный медицинский университет, Казань

³ Институт стволовых клеток человека, Москва

На модели хронического фиброзирующего гепатита у крыс ($n = 75$) изучена динамика развития фибролитического действия ММСК костного мозга (КМ) при однократном и двукратном применении этих клеток на раннем этапе фиброзирования печени.

При динамическом морфометрическом изучении в течение 90 суток площади фиброзной ткани в печени, экспрессии маркеров активированных звездчатых клеток (десмин, α -ГМА) и маркеров клеточного апоптоза (каспаза-3, каспаза-9) установлены две фазы в развитии фибролитического действия ММСК КМ. Показано, что развитие фибролитического эффекта включает фазу первоначального усиления фиброза, которая сменяется фазой усиления фибролитических процессов в печени. Установлено, что двухфазная динамика наиболее выражена при двукратном применении ММСК КМ.

Ключевые слова: хронический фиброзирующий гепатит, клетки костного мозга.

TWO-PHASE DYNAMICS OF BONE MARROW MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELLS (MMSC) ACTION ON LIVER AT MODELING OF FIBROTIC HEPATITIS

Onishchenko N.A.¹, Lyundup A.V.¹, Gazizov I.M.², Deev R.V.³, Shagidulin M.Y.¹, Krashennnikov M.E.¹, Avramov P.V.¹

¹ Academician V.I. Schumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow

² Kazan State Medical University, Kazan

³ Human Stem Cells Institute, Moscow

Under the modeling of chronic fibrousing hepatitis in rats ($n = 75$) the dynamics of fibrolytic effect of bone marrow MMSC was examined after one or two-time infusion of these cells at the early stage of liver fibrosis. By dynamic measuring of liver fibrotic area and the expression of activated stellate cell markers (desmin, α -SMA) and markers of cell apoptosis (caspase-3 and caspase-9) within 90 days two phases of the development of bone marrow MMSC fibrolytic effect were found.

It is shown that the development of fibrolytic effect includes the primary phase of intensification of fibrosis, which is followed by the phase of enhanced fibrolytic process in the liver. It was determined that the two-phase dynamics of liver regeneration was more intensive after two-time infusion of bone marrow MMSC.

Key words: chronic fibrotic hepatitis, bone marrow cells, cell therapy.

Статья поступила в редакцию 23.05.11 г.

Контакты: Онищенко Нина Андреевна, д. м. н., профессор, зав. лабораторией биотехнологии стволовых клеток.

Тел. 8 (499) 190-45-31, e-mail: illak@mail.ru

Принято считать, что цирроз печени является необратимым патологическим состоянием. Однако экспериментальные и клинические наблюдения последних лет убеждают в возможности морфологического регресса склеротических изменений в печени путем принудительного перепрограммирования процессов фибротической регенерации за счет активного включения в него интегративных систем регуляции с помощью тканевых, клеточных и пептидных методов терапии [7, 13, 15].

Особенно важную роль в индукции восстановительной регенерации печени играют клетки КМ, которые, как полагают, вместе с синусоидальными клетками печени образуют единую функциональную систему регуляции морфогенеза здоровой и поврежденной печени [18, 20, 12].

Показано, что среди клеток КМ регуляторные функции наиболее выражены у мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) [6].

Эти клетки с помощью паракринных механизмов нейтрализуют действие провоспалительных цитокинов, ослабляют выраженность воспалительного ответа, тормозят дифференцировку звездчатых клеток печени в активированные миофибробласты, продуцирующие коллагены [2, 4], а также индуцируют их апоптоз за счет снижения экспрессии тканевых ингибиторов матриксных протеиназ и сопряженной активации матриксных металлопротеиназ [9].

Общим итогом применения ММСК КМ становится снижение процессов фиброобразования печени при ее повреждении. Однако не все исследователи признают фибролитический эффект клеток КМ и их способность индуцировать апоптоз звездчатых клеток печени при развивающемся фиброзе [17, 3].

Более того, появились работы о том, что клетки КМ сами вносят вклад в развитие фиброза печени, так как существенно увеличивают в ней популяцию звездчатых клеток [10, 5].

Противоречивость мнений о регулирующем воздействии клеток КМ, в частности ММСК, на процессы фиброгенеза в печени послужила основанием для проведения настоящего исследования.

Целью исследования явилось динамическое изучение особенностей развития фиброгенеза в печени при хроническом фиброзирующем гепатите без и на фоне применения ММСК КМ здоровых доноров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 75 крысах-самцах породы Вистар, содержащихся в виварии на смешанном рационе питания со свободным доступом к воде. У всех этих крыс моделировали хронический фиброзирующий гепатит (ХФГ) путем подкожных инъекций 60% CCl_4 на персиковом масле по отработанной схеме в течение 6 недель. Суммарная кур-

совая доза чистого CCl_4 составила 3,5 мл/100 г веса животного. После завершения затравки все крысы были разделены на 3 группы (по 25 в каждой группе) для дальнейшего изучения особенностей корригирования процессов фиброобразования печени путем внутривенного введения (в хвостовую вену) ММСК КМ. В I группе животным с ХФГ ММСК КМ вводили в дозе $2,5 \times 10^6$ клеток однократно на 3-и сутки после моделирования ХФГ. Во II группе животным с ХФГ ММСК КМ вводили дважды на ранней стадии моделирования ХФГ (на 3-и и 10-е сутки) в общей дозе 5×10^6 клеток. III группа служила контролем (спонтанная регенерация печени после моделирования ХФГ без клеточной терапии). Донорами ММСК КМ служили аллогенные здоровые доноры (крысы породы Вистар), так как у аутологичных клеток КМ после затравки CCl_4 было выявлено резкое и пролонгированное снижение адгезивной и популяционной активности, причем первичная культура содержала большое количество дебриса (погибших клеток). В экспериментах использовали ММСК 1-го и 2-го пассажей; гомогенность культуры ММСК аллогенного КМ крыс была подтверждена иммуногистохимически с помощью кроличьих моноклональных антител к коллагену 1-го типа («Имтек», Россия). Во всех группах экспериментов в течение 3 месяцев после моделирования ХФГ проводили контроль динамики изменения биохимических показателей крови (АЛТ, АСТ, ЩФ) и гистологических срезов ткани печени. Проводили морфометрическую оценку динамики изменений площади образующейся соединительной ткани (окраска по Маллори), а также иммуногистохимическое выявление динамики изменения общего количества активированных звездчатых клеток, предопределяющих развитие процессов фиброобразования печени, и общего количества клеток печени, подвергшихся процессам обратимого и необратимого апоптоза.

Иммуногистохимические исследования проводили стрептавидин-биотиновым методом с использованием антител к соответствующим антигенам. Для выявления активированных звездчатых клеток проводили окраску моноклональными антителами («Дако», Дания) к десмину – белку промежуточных филаментов, и к альфа-гладкомышечному актину (α -ГМА) антителами («Абкам», США) – маркеру миофибробластоидной дифференцировки. Для оценки выраженности апоптоза клеток использовали антитела («Абкам», США) к каспазе-3 – маркеру необратимого расщепления компонентов клетки, и к каспазе-9 – маркеру обратимого апоптоза.

Результаты работы были подвергнуты статистической обработке на ПК с использованием статистического пакета Biostat; достоверность различий между сравниваемыми группами опытов оценивали по критерию t-Стьюдента с учетом поправки Бонферонни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По окончании моделирования ХФГ у выживших животных (гибель составила 20%) отмечались клинические признаки токсического повреждения печени: снижение двигательной активности и массы тела, частичное выпадение волосяного покрова. Продолжая динамическое наблюдение за клиническим состоянием этих животных, мы отметили более быструю и более выраженную нормализацию функции гепатоцитов у животных I и II групп, получивших терапию ММСК, особенно в группе с двукратным применением клеток (II группа) по сравнению с контролем (III группа). Результаты исследования динамики восстановления уровня цитолитических ферментов печени в сыворотке крови представлены в таблице. Из таблицы видно, что нормализация АлАТ во II группе наступала уже на 14-е сутки; АсАТ и ЩФ – на 21-е сутки.

При гистологическом исследовании уже на самых ранних сроках после завершения моделирования ХФГ (а именно на 3-и сутки) в ткани печени возникали отчетливые структурные изменения: наряду с жировой дистрофией гепатоцитов и увеличением количества двуядерных гепатоцитов возникали участки ложных долек и происходило формирование внутридолькового фиброза за счет врастания коллагеновых волокон между гепатоцитами. Однако на 14-е сутки после моделирования ХФГ в печени животных разных экспериментальных групп возникли неожиданные для нас структурные изменения. В III, контрольной группе (без применения ММСК КМ) сохранялись признаки жировой дистрофии гепатоцитов, но структурные признаки фиброзы печени практически полностью нивелировались (рис. 1, а).

В то же время в опытах I группы (с однократной трансплантацией ММСК КМ на 3-и сутки) и в

опытах II группы (с двукратной трансплантацией ММСК КМ на 3-и и 10-е сутки) на фоне крупнокапельной жировой дистрофии гепатоцитов происходило отчетливое разрастание соединительной ткани и образование ложных долек (рис. 1, б и в), особенно выраженное в печени крыс II группы при двукратном введении ММСК КМ. При дальнейшем динамическом изучении изменений площади фиброзной ткани в срезах печени разных групп (начиная с 14-х суток) нами были получены данные, показывающие, что в I и особенно во II группе после первоначального усиления процессов фиброзы в печени, в отдаленные сроки (на 60-е и 90-е сутки после моделирования ХФГ) в печени развивались отчетливо выраженные фибролитические процессы (рис. 2).

Мы отметили также, что в III, контрольной группе с 14-х по 28-е сутки процессы фиброзы в ткани печени не прогрессировали (стабилизация за счет нативных резервов тканевой адаптации), но затем с 28-х до 60-х и 90-х суток процессы фиброзы резко активизировались, указывая на развитие дефицита внутритканевых резервов адаптации к токсическому повреждению. В то же время в группах с применением ММСК развитие процессов фиброзы печени было не столь выраженным в I группе и практически отсутствовало во II группе при двукратном применении ММСК КМ (рис. 2). Двухфазная динамика развития фибролитического действия ММСК при ХФГ позволила нам признать, что клеточная терапия, по сути, представляет собой вариант адаптивной терапии, а ММСК КМ при этом выступают в роли достаточно эффективного адаптогена. Как всякий патогенетически значимый адаптоген, ММСК КМ, будучи примененными в достаточной дозе (при двукратном применении) и в условиях, когда еще сохранены (не израсходованы)

Таблица

Динамика изменения содержания цитолитических ферментов в сыворотке крови при моделировании ХФГ без и на фоне применения ММСК КМ

Сутки	АлАТ (норма до 40 ед./мл)			АсАТ (норма до 60 ед./мл)			ЩФ (норма до 300 ед./мл)		
	контроль CCl ₄ III гр.	CCl ₄ + 2,5 млн ММСК I гр.	CCl ₄ + 5 млн ММСК II гр.	контроль CCl ₄ III гр.	CCl ₄ + 2,5 млн ММСК I гр.	CCl ₄ + 5 млн ММСК II гр.	контроль CCl ₄ III гр.	CCl ₄ + 2,5 млн ММСК I гр.	CCl ₄ + 5 млн ММСК II гр.
7	183,1 ± 15,3*	#70,24 ± 8,9*	#70,24 ± 8,9*	198,3 ± 19,6*	148,14 ± 20,5*	148,14 ± 20,5*	1484,8 ± 65,0*	519 ± 20,2*	519 ± 34,4*
14	58,3 ± 5,3*	51,21 ± 5,1	31,66 ± 7,5	147,1 ± 13,3*	95,91 ± 14,4*	#89,26 ± 13,2*	399,3 ± 33,4	#509 ± 17,3*	400,4 ± 43,3
21	45,65 ± 4,2	41,73 ± 4,2	17,02 ± 7,2	147,5 ± 12,8*	#63,81 ± 7,6	#42 ± 3,0	481,5 ± 21,1*	#678,73 ± 19,9*	337,5 ± 33,3
28	42,2 ± 5,1	22,1 ± 3,7	40,45 ± 4,0	54,1 ± 6,0	66,4 ± 7,8	13 ± 7,7	420,1 ± 15,2*	#126 ± 34,8	#266 ± 27

* – p < 0,05 по сравнению с нормой (интактные крысы).

– p < 0,05 по сравнению с контролем на тот же срок наблюдения.

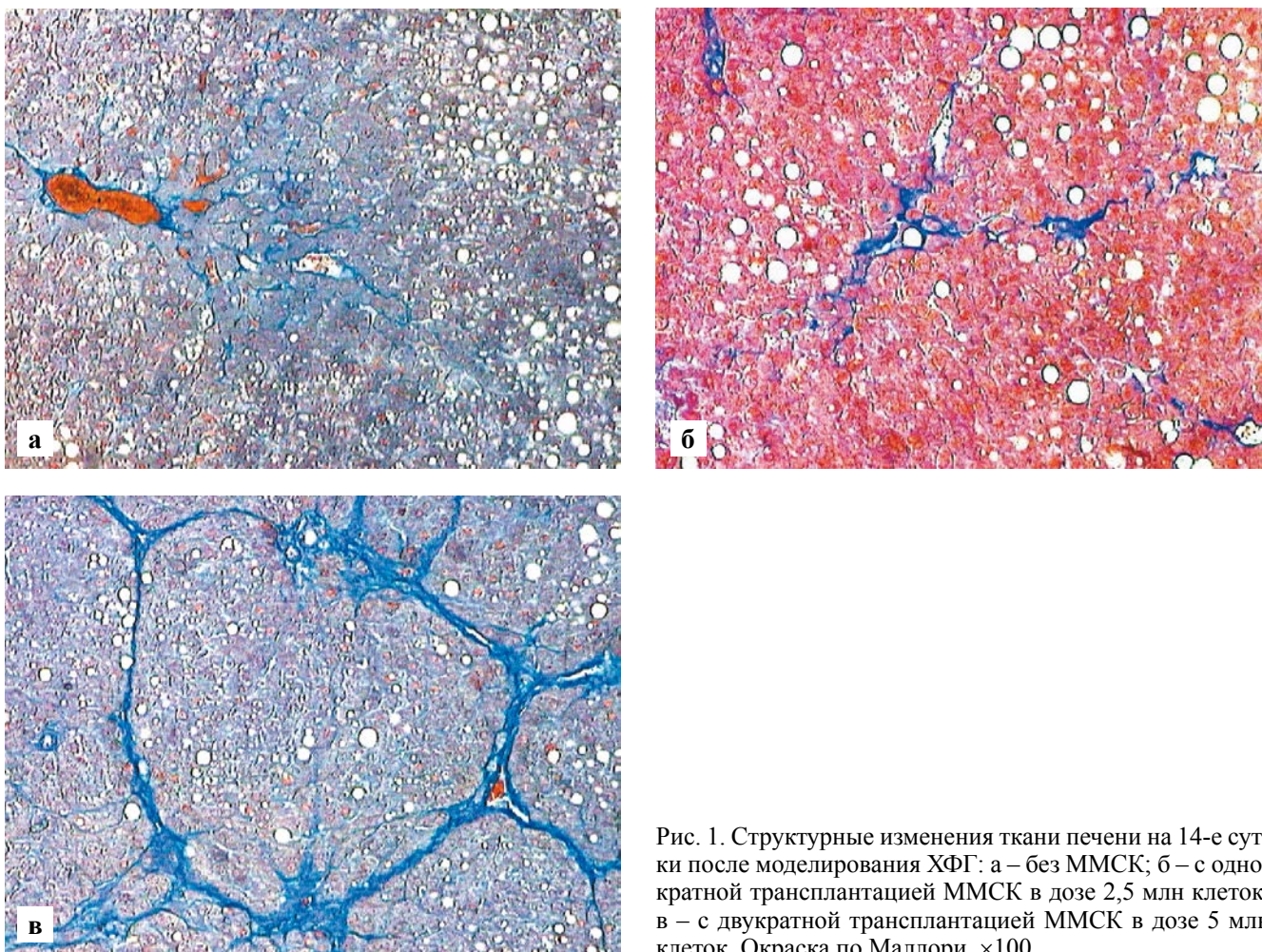
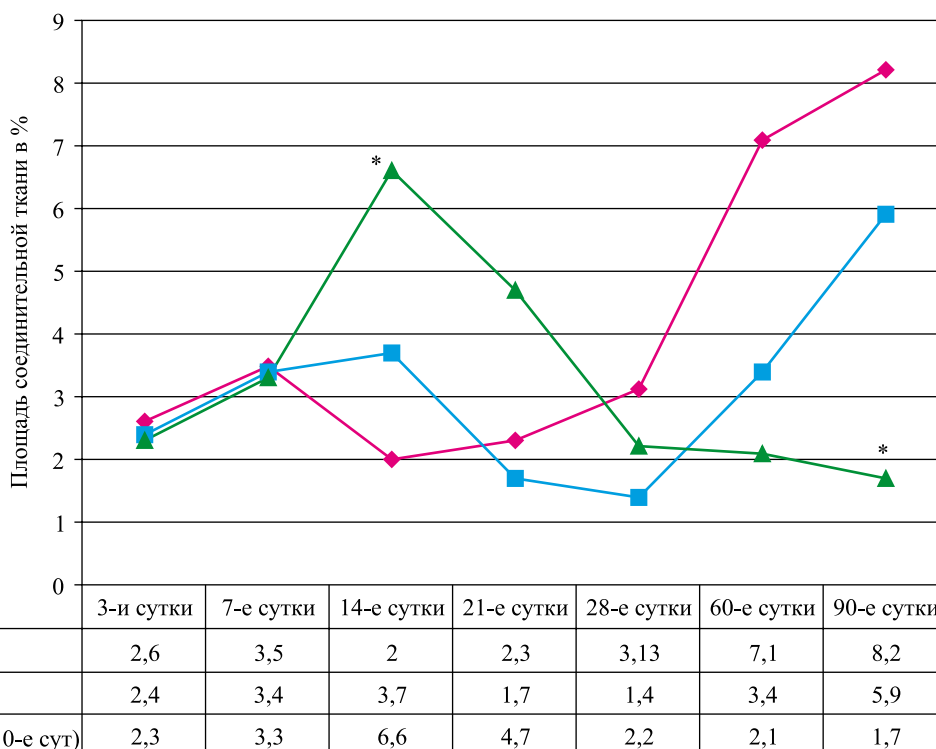


Рис. 1. Структурные изменения ткани печени на 14-е сутки после моделирования ХФГ: а – без ММСК; б – с однократной трансплантацией ММСК в дозе 2,5 млн клеток; в – с двукратной трансплантацией ММСК в дозе 5 млн клеток. Окраска по Маллори. ×100



* – p < 0,05 по сравнению с контролем на тот же срок наблюдения.

Рис. 2. Динамика изменения площади фиброзной ткани в печени, при моделировании токсического ХФГ без и с последующей трансплантацией ММСК КМ на ранних сроках развития ХФГ (норма площади соединительной ткани 1,4%)

внутриклеточные резервы адаптации (на раннем этапе развития ХФГ), способны осуществить энергозависимую перестройку процессов фиброзирующей регенерации, перепрограммировав ее на индукцию восстановительной регенерации, при которой в ткани печени нивелируются процессы фиброгенеза.

Действительно, на 60-е и особенно на 90-е сутки после завершения моделирования ХФГ в группе с двукратной трансплантацией ММСК (рис. 3) соединительная ткань в печени практически не выявляется (в том числе в пространствах Диссе): в группе с однократной трансплантацией ММСК в печень (рис. 3, б) отмечалось развитие соединительной ткани, но в меньшей степени по сравнению с контролем. В контрольной группе (рис. 3, а) к 60-м и 90-м суткам архитектура ткани печени оказывалась резко нарушенной: был выражен цирроз и фиброз, в том числе внутريدольковый с «капилляризацией» синусоидов, которые косвенно свидетельствуют о глубоких нарушениях структуры и функции непаренхиматозных клеток печени, и прежде всего звездчатых клеток. Этим клеткам, по современным представлениям, отводят роль ство-

ловых клеток печени наряду с овальными клетками [1, 11], а в поврежденной печени – роль продуцентов коллагена и индукторов фиброгенеза за счет развивающейся в них миофибробластоидной трансдифференцировки [8, 14, 16].

Выраженность утраты стволовых функций у звездчатых клеток в процессе развития ХФГ и после применения ММСК КМ оценивали по количеству выявленных в печени активированных звездчатых клеток, которые экспрессируют десмин и α -ГМА – маркеры миофибробластоидного фенотипа этих клеток. Оказалось, что экспрессия десмина (рис. 4, а) и α -ГМА (рис. 4, б) была более выраженной в группе с двукратным введением ММСК на ранних сроках развития ХФГ, тогда как к концу наблюдения (на 60-е сутки) экспрессия этих маркеров становилась достоверно сниженной по сравнению с контролем. Такая динамика экспрессии маркеров активированных звездчатых клеток в опытах с введением ММСК указывает на достоверное снижение в печени количества клеток, продуцирующих соединительную (фиброзную) ткань и соответствует вышеприведенным результатам наших опытов о

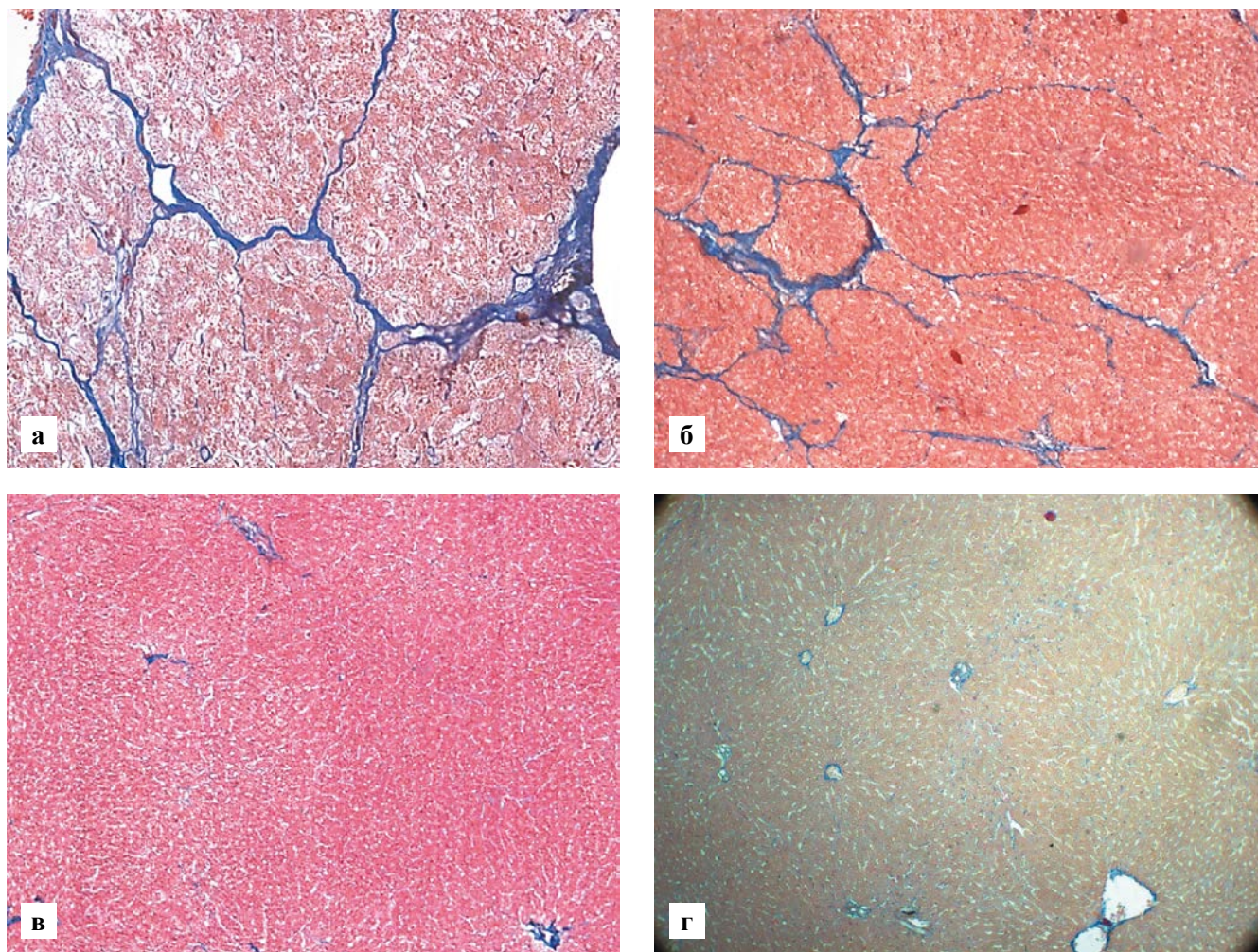


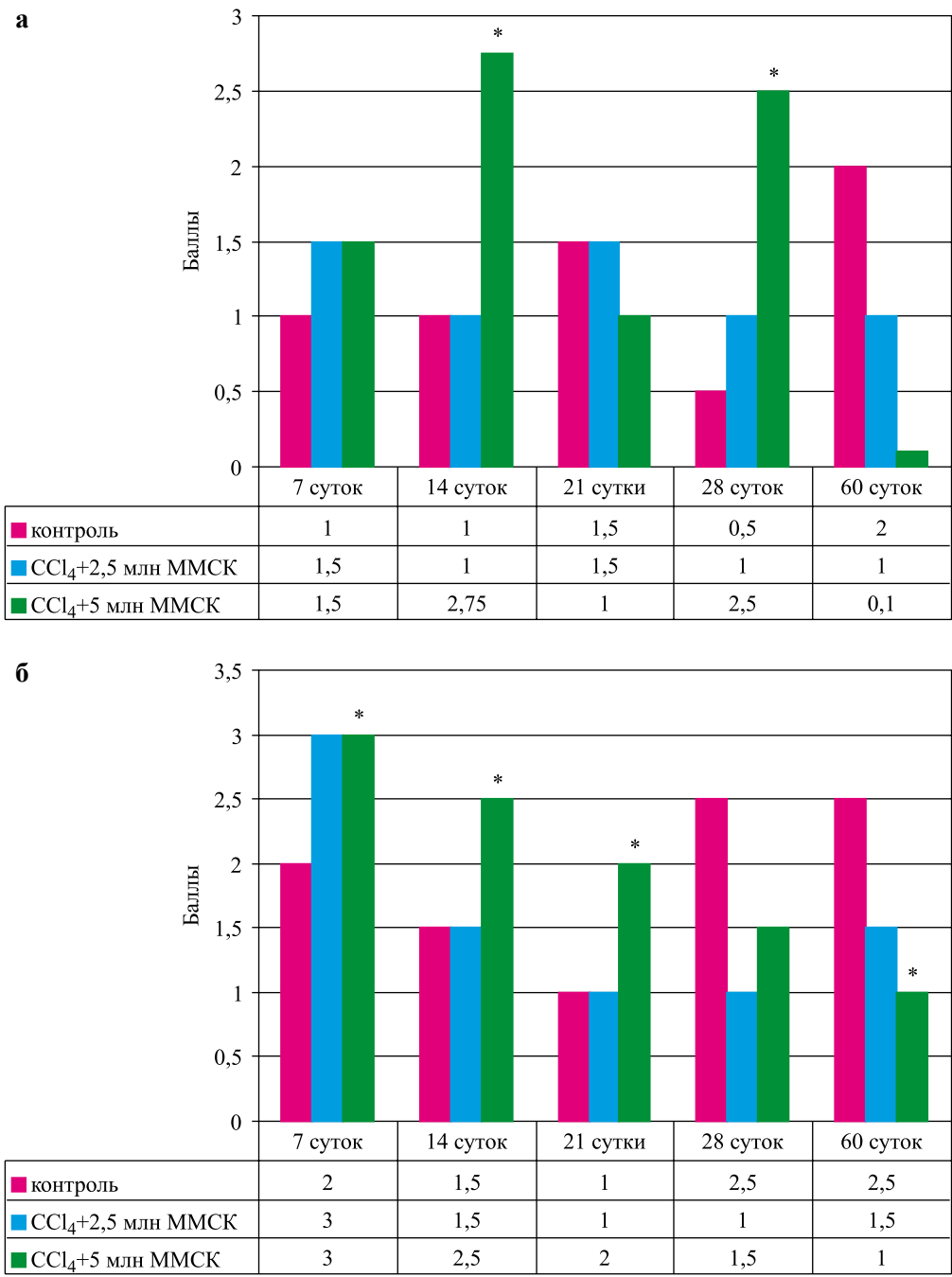
Рис. 3. Структурные изменения ткани печени на 90-е сутки после моделирования ХФГ: а – без ММСК; б – с однократной трансплантацией ММСК в дозе 2,5 млн клеток; в – с двукратной трансплантацией ММСК в дозе 5 млн клеток; г – нормальная ткань печени. Окраска по Маллори. $\times 100$

достоверном снижении площади фиброзной ткани к 60-м и 90-м суткам наблюдения при двукратном введении ММСК (рис. 2).

Снижение количества активированных звездчатых клеток в отдаленные сроки наблюдения может быть обусловлено прежде всего усилением их апоптоза. Проведенное нами изучение в динамике процессов клеточного апоптоза показало, что при ХФГ и на фоне применения ММСК в печени первоначально усиливаются процессы как необратимого (каспаза-3), так и обратимого, т. е. адапционно-зависимого (каспаза-9) апоптоза (рис. 5).

Важно, однако, отметить, что на 14, 28 и 60-е сутки содержание клеток, экспрессирующих каспазу-9 во II группе, где проводилось двукратное применение ММСК, было при всех сроках выше, чем в контрольной группе (рис. 5, а), и соотношение величин этого показателя (в баллах) – 1,25; 2,5 и 2,0 в сравниваемых группах (II и III) на указанные сроки свидетельствовало о продолжающемся развитии в печени адапционных обратимых перестроек в группе с ММСК даже в отдаленные сроки.

Между тем отношение содержания в печени клеток, экспрессирующих каспазу-3 – маркер необра-



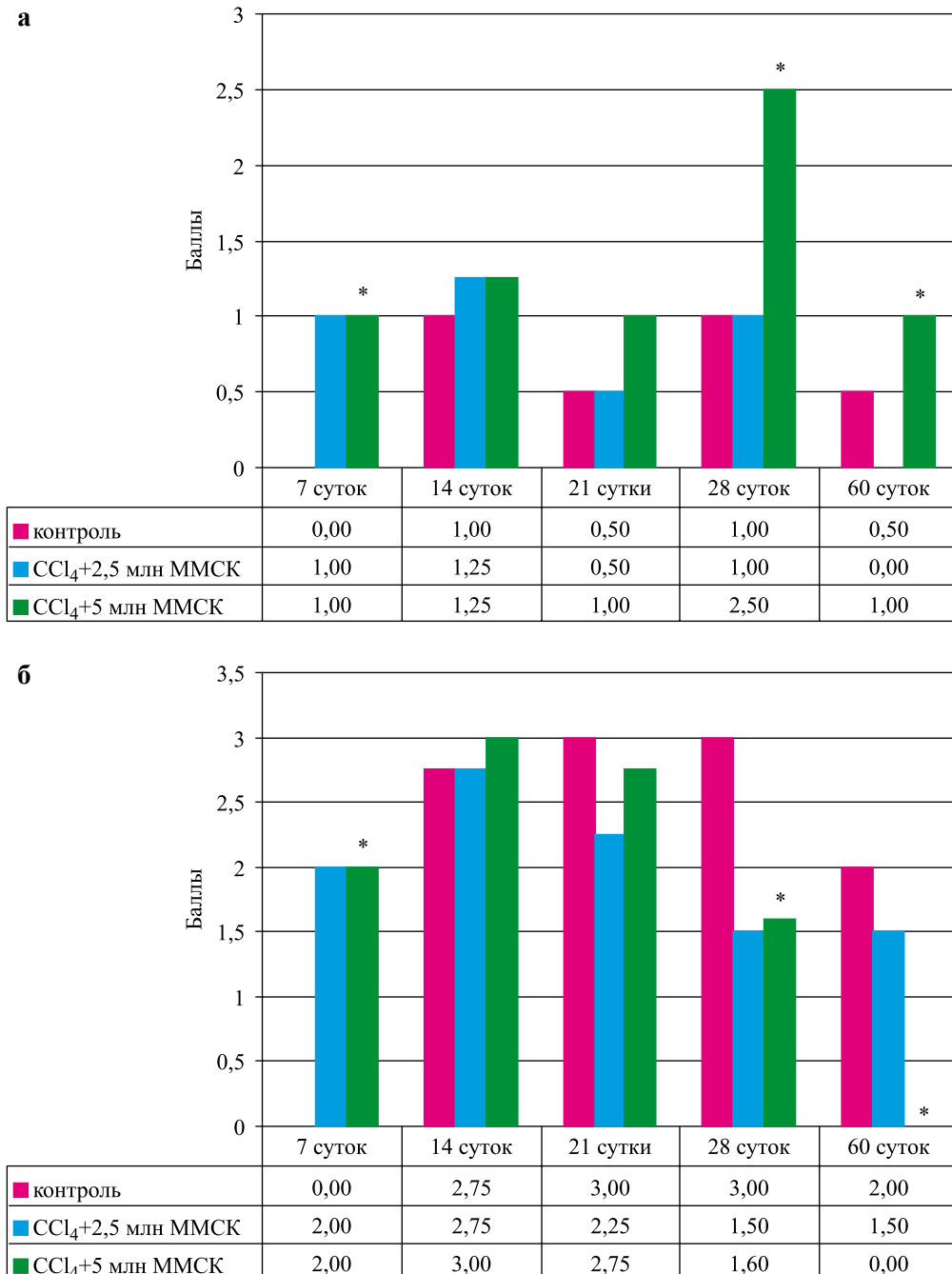
* – $p < 0,05$ по сравнению с контролем на тот же срок наблюдения.

Рис. 4. Динамика изменения количества активированных звездчатых клеток в ткани печени, экспрессирующих десмин (а) и альфа-гладкомышечный актин (б) при моделировании ХФГ и введении ММСК КМ для коррекции ХГ

тимой гибели клеток, в те же временные интервалы (рис. 5, б) и в тех же группах составило: 1,1; 0,5 и 0, что указывало на снижение и даже полное нивелирование необратимого апоптоза клеток печени в отдаленные сроки после применения ММСК.

Таким образом, при моделировании ХФГ и применении ММСК КМ в достаточной дозе (двукратное применение) на раннем этапе фиброобразования печени выявлена двухфазная динамика развития фибролитического действия ММСК. Сначала в печени под влиянием ММСК индуцируются адаптивные

процессы для перепрограммирования регенерационных процессов с фиброзирующего типа регенерации на восстановительную регенерацию. Адаптивные процессы всегда сопровождаются усилением энергозатрат и развитием энергодефицита, что находит отражение в усилении деструктивных процессов на раннем этапе после применения ММСК: увеличение площади фиброобразования печени, увеличение экспрессии маркеров фибробластной дифференцировки звездчатых клеток – десмина и α -ГМА, увеличение экспрессии маркеров обрати-



* – $p < 0,05$ по сравнению с контролем на тот же срок наблюдения.

Рис. 5. Динамика изменения количества клеток печени, экспрессирующих каспазу-9 (а) и каспазу-3 (б), при введении ММСК КМ для коррекции ХФГ. Отсутствие показателя в отдельные временные интервалы указывает на отсутствие иммуногистохимической реакции

мого (каспаза-9) и необратимого (каспаза-3) апоптоза. Перераспределение внутриорганных и системных резервов адаптации с помощью ММСК КМ на раннем этапе развития ХФГ способствует осуществлению перепрограммирования процессов регенерации в печени, и результатом этого становится отчетливо выраженный фибролитический эффект в отдаленном периоде, а также снижение количества активированных звездчатых клеток (снижение десмина и α -ГМА) и клеток в состоянии необратимого апоптоза. Достаточно высокий уровень экспрессии каспазы-9 в течение всего срока наблюдения заставляет признать важную роль адаптационных процессов для обеспечения устойчивой восстановительной регенерации печени.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гумерова А.А., Киясов А.П. Могут ли перисинусоидальные клетки быть региональными стволовыми (прогениторными) клетками печени? // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2010. Т. 5 (1). С. 33–40.
2. Aziz M.T.A., Atta H.M., Mahfouz S. et al. Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on experimental liver fibrosis // Clin. Biochem. 2007. Vol. 40. P. 893–899.
3. Bonzo L.V., Ferrero I., Cravanzola C. et al. Human mesenchymal stem cells as a two-edged sword in hepatic regenerative medicine: engraftment and hepatocyte differentiation versus profibrogenic potential // Gut. 2008. Vol. 57. P. 223–231.
4. Dai L.J., Li H.Y. et al. The therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on hepatic cirrhosis // Stem. Cell Res. 2009. Vol. 2 (1). P. 16–25.
5. Dalakas E., Newsome P.N., Boyle S. et al. Bone marrow stem cells contribute to alcohol liver fibrosis in humans // Stem. Cells Dev. 2010 Sep. Vol. 19 (9). P. 1417–1425.
6. Dugast A., Vanhove B. Immune regulation by non-lymphoid cells in transplantation // Clin. Exp. Immunol. 2009 April. Vol. 156 (1). P. 25–34.
7. Friedman S.L. Reversibility of hepatic fibrosis and cirrhosis – is it all hype? // Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol. 2007. Vol. 4. P. 236–237.
8. Friedman S.L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver // Physiol. Rev. 2008. Vol. 88. P. 125–172.
9. Higashiyama R., Inagaki Y., Hong Y.Y. et al. Bone marrow-derived cells express matrix metalloproteinases and contribute to regression of liver fibrosis in mice // Hepatology. 2007. Vol. 45. P. 213–222.
10. Higashiyama R., Moro T., Nakao S. et al. Negligible contribution of bone marrow-derived cells to collagen production during hepatic fibrogenesis in mice // Gastroenterology. 2009 Oct. Vol. 137 (4). P. 1459–1466.
11. Kordes C., Sawitza I., Müller-Marbach A. et al. CD133+ hepatic stellate cells are progenitor cells // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007 Jan 12. Vol. 352 (2). 417 p.
12. Kuo T.K., Hung S. et al. Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success for using bone marrow mesenchymal stem cells // Gastroenterology. 2008. Vol. 134. P. 2111–2121.
13. Parekkadan B., Poll D., Suganuma K. et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure // PLoS One. 2007. Vol. 2 (9). P. e941.
14. Parola M., Marra F., Pinzani M. Myofibroblast-like cells and liver fibrogenesis: emerging concepts in a rapidly moving scenario // Mol. Aspects. Med. 2008. Vol. 29. P. 58–66.
15. Poll D., Parekkadan B., Cho C.H. et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration *in vitro* and *in vivo* // Hepatology. 2008. Vol. 47. P. 1634–1643.
16. Povero D., Busletta C., Novo E. et al. Liver fibrosis: a dynamic and potentially reversible process // Histol. Histopathol. 2010 Aug. Vol. 25 (8). P. 1075–1091.
17. Russo F.P., Alison M.R., Bigger B.W. et al. The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis // Gastroenterology. 2006. Vol. 130. P. 1807–1821.
18. Sakaida I., Terai S., Yamamoto N. et al. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl₄-induced liver fibrosis in mice // Hepatology. 2004. Vol. 40. P. 1304–1311.
19. Yagi H., Soto-Gutierrez A., Navarro-Alvarez N. et al. Reactive bone marrow stromal cells attenuate systemic inflammation via sTNFR1 // Mol. Ther. 2010 Oct. Vol. 18 (10). P. 1857–1864.
20. Yu Y., Yao A.H., Chen N. et al. Mesenchymal stem cells over-expressing hepatocyte growth factor improve small-for-size liver grafts regeneration // Mol. Ther. 2007. Vol. 15. P. 1382–1389.