

ЭФФЕКТИВНОСТЬ КЛЕТОЧНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПРИ РЕПАРАЦИИ ПОВРЕЖДЕНИЯ ПЕЧЕНИ МЫШИ

© 2017 г. Е. С. Коробко^{а, *}, Е. А. Супруненко^{а, **}, А. В. Васильев^{а, б}

^аМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет
119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

^бИнститут биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН
119334, Россия, Москва, ул. Вавилова, д. 26

*E-mail: katekorobko@gmail.com

**E-mail: suprunenkoe@mail.ru

Поступила в редакцию 01.09.2016 г.

Сопоставлена результативность двух способов трансплантации мышам клеток линии гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2 и аллогенных мезенхимных стромальных клеток жировой ткани (МСК ЖТ) в целях выбора наиболее эффективного для репарации повреждений печени. Показано значительное преимущество трансплантации клеток в селезенку по сравнению с внутрибрюшинным введением. Установлено, что при аналогичных способах трансплантации МСК ЖТ обнаруживаются в ткани печени в меньших количествах, чем клетки линии гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2, выявлены различия в локализации клеток этих типов в печени. На модели индуцированного тетрахлоридом углерода фиброза печени мышцы прослежена тенденция к снижению степени фибrotических изменений ткани печени после трансплантации МСК ЖТ и, в большей степени, МСК ЖТ, предварительно обработанных интерлейкином-6.

Ключевые слова: печень, клеточная трансплантация, фиброз печени, мезенхимные стромальные клетки жировой ткани

DOI: 10.7868/S0475145017010062

ВВЕДЕНИЕ

Печень – уникальный орган по своей способности к регенерации. Токсические повреждения печени могут быть вызваны как непосредственным влиянием агентов, в том числе алкоголя, так и такими заболеваниями, как, например, вирусный гепатит, аутоиммунные заболевания и т.д. Репарация печени после токсических повреждений связана с дифференцировкой гепатоцитов *de novo*.

С развитием клеточных технологий появилась возможность усиливать репарационные процессы в печени за счет экзогенных клеток, в т.ч. и стволовых (Петракова и др., 2012). В настоящее время известно несколько способов трансплантации клеток для стимуляции репарации ткани печени, однако по данным литературы трудно сопоставить их эффективность, поскольку в работах, даже проведенных на одном модельном объекте, часто используют различные типы клеточных продуктов. В данной работе мы сопоставили эффективность двух способов трансплантации (внутрибрюшинно и в селезенку) двух типов клеточных культур: аллогенных МСК ЖТ и клеток линии гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2.

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) являются одним из возможных ресурсов для клеточной трансплантации с целью усиления репарационных процессов в поврежденной печени. Однако остается дискуссионным вопрос, происходит ли усиление репарационных процессов в ткани печени за счет непосредственно прямой дифференцировки МСК в гепатоцитарном направлении *in vivo*, либо МСК выступают регуляторным звеном, способным усиливать реализацию регенеративного потенциала региональных стволовых клеток печени. Известно, что МСК служат важнейшим источником факторов роста и цитокинов, принимающих участие в регуляции регенерации тканей (Калинина и др., 2011).

В настоящее время предпринимаются попытки усиления регенерационного эффекта (потенциала) МСК при трансплантации в поврежденную печень, в частности за счет преинкубации с цитокинами. Так, на мышах показано, что трансплантация предварительно обработанных МСК *in vitro* раствором комплекса цитокинов (HGF, FGF4) приводила к усилению репарационного эффекта. Однако следует учитывать, что данные ростовые факторы прежде всего способствуют

дифференцировке МСК в гепатоцитоподобные клетки (Shams et al., 2014). Другим из важнейших цитокинов, участвующих в репарационных процессах в печени, является интерлейкин-6 (IL-6). Известно, что прежде всего он оказывает влияние на ремоделирование (деградацию) внеклеточного матрикса на начальных этапах регенерации ткани печени (Tarla et al., 2006). На первичных культурах гепатоцитов показан митогенный эффект IL-6 (при использовании в концентрации 10 нг/мл) (Nasir et al., 2016).

В нашей работе мы сопоставили репарационные эффекты в печени мышей с фиброзом, индуцированным четыреххлористым углеродом (CCl₄), при трансплантации аллогенных интактных и преинкубированных с IL-6 МСК ЖТ. Данная модель повреждения печени наиболее часто используется в такого рода исследованиях (Michalopoulos, 2007). CCl₄ метаболизируется гепатоцитами, что ведет к образованию токсичных трихлорметильных (CCl₃) радикалов, которые опосредуют цитотоксические эффекты и, в конечном итоге, приводят к массовому некрозу печени (Liedtke, 2013).

В целом, фиброз печени является патологическим результатом хронических воспалительных заболеваний печени и характеризуется пролиферативной активностью звездчатых клеток (клеток Ито) печени (Налобин и др., 2016) и дифференцировки их в миофибробластоподобные клетки (Fujii et al., 2010). В случае прекращения действия медиаторов воспаления, клетки Ито снова начинают продуцировать профибротические вещества и происходит уменьшение компонентов внеклеточного матрикса. Таким образом, фиброз на ранних стадиях развития является обратимым процессом (Курышева, 2010).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток

Культивирование клеток линии гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2. Для ведения культуры использовали среду DMEM (ПанЭко, Россия, С420п) с добавлением телячьей эмбриональной сыворотки крови 10% (ПанЭко, Россия), глутамина (292 г) (ПанЭко, Россия, Ф032) и гентамицина 50 мкг/мл. Клетки культивировали в стандартных условиях (37°C, 5% CO₂). Пассирование культуры проводили при достижении монослоя раз в 7 дней.

Культивирование МСК, выделенных из жировой ткани. В качестве доноров МСК ЖТ использовали самцов гибридов C57Bl/СВА в возрасте 3 мес. Выделение МСК ЖТ проводили по стандартной методике: жировую ткань промывали в растворе фосфатного буфера (DPBS) (ПанЭко, Россия) с гентамицином (350 мкг/мл), далее ткань подвергали ферментации в 0.075%-м растворе коллагеназы II

(Sigma-Aldrich, USA, С6885-500MG), центрифугировали, осадок ресуспендировали в ростовой среде, высаживали в культуральные флаконы. Через сутки удаляли неприкрепившиеся клетки. Среда культивирования: DMEM (ПанЭко, Россия, С420п) с добавлением телячьей эмбриональной сыворотки крови 10% (ПанЭко, Россия), глутамина (292 г) (ПанЭко, Россия, Ф032) и гентамицина 50 мкг/мл. Культивирование проводили в стандартных условиях (37°C, 5% CO₂). В работе были использованы клетки 2–3 пассажей.

Характеристика МСК ЖТ мыши методом проточной цитофлуориметрии

В качестве характеристических маркеров использовали белки кластеров дифференцировки: CD90 (Millipore, #CBL1500F); CD44 (AbCam, #ab25064); CD45 (Millipore, #FCMAB126F). Окрашивание проводили на маркеры CD90 (10 мкл/мл) (Millipore, #CBL1500F); CD44 (20 мкл/мл) (AbCam, #ab25064); CD45 (5 мкл/мл) (Millipore, #FCMAB126F) по инструкциям производителя. В качестве контроля были использованы неокрашенные клетки. Окрашенные образцы клеток подвергали анализу на проточном цитофлуориметре (Beckman Coulter, Cell Lab Quanta SC). В работе было использовано 4 образца клеток, содержащих 3×10^5 МСК ЖТ в 1 мл PBS.

Визуализация трансплантированных клеток в тканях

Клетки HepG2 и МСК ЖТ окрашивали флуоресцентным красителем Hoechst № 33342 (Sigma Aldrich) (0.04 мг/мл) в течение 1 часа перед трансплантацией. На 5-е сут после трансплантации печени реципиента извлекали с соблюдением норм биоэтики и выявляли в ней локализацию трансплантированных клеток при освещении ультрафиолетом ($\lambda = 365$ нм).

Для визуализации трансплантируемых МСК ЖТ на криосрезах печени перед трансплантацией их докрашивали мембранным красителем CellMask™ Deep Red Plasma membrane Stain (ThermoFisher, С10046) (7.5 мкг/мл) в течение 1 часа.

Для визуализации трансплантированных клеток линии HepG2 непосредственно на криосрезах печени мыши были использованы моноклональные антитела Anti-Nuclei Antibody, clone 235-1, Alexa Fluor® 488 conjugate (Millipore, #MAB1281A4) (5 мкл/мл), окрашивание проводили по инструкциям производителя.

Трансплантация клеток

Суспензию трансплантируемых клеток в бесывороточной среде DMEM (ПанЭко, Россия) вводили реципиентам (1 способ) внутрибрюшин-

но (1×10^6 кл. в 200 мкл) или (2 способ) в селезенку (5×10^6 кл. в 50 мкл).

Оценка эффективности трансплантации МСК ЖТ на модели индуцированного фиброза

В работе использовали самцов мышей гибридов С57В1/СВА в возрасте 3 мес. Для индукции фиброза мышам проводили внутрибрюшинные инъекции CCl_4 (1 мкл/г веса животного) в виде 30% раствора персикового масла дважды в неделю. Инъекции проводили в течение 3.5 недель. Контролем служили интактные самцы из той же возрастной группы. После окончания серии инъекций одной группе животных проводили внутриселезеночную аллогенную трансплантацию МСК ЖТ, второй группе – МСК ЖТ, обработанные интерлейкином-6. Третья группа мышей с индуцированным фиброзом служила контролем регрессии фиброза. В каждую из групп входило не менее трех самцов. Через 14 суток после трансплантации клеток мышей выводили из эксперимента, соблюдая правила биоэтики: наркотизировали с помощью авертина (700–1000 мкл/мышь). Степень фибротизации ткани печени оценивали на гистологических препаратах, приготовленных по стандартной методике (толщина срезов 4–5 мкм, окраска по методу Маллори) по шкале METAVIR.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При внутрибрюшинной трансплантации клеток линии HepG2 на пятые сутки просмотр печени под ультрафиолетом не выявил областей свечения, характерных для меченных Hoechst № 33342 клеток HepG2 (рис. 1). На внутренней поверхности брюшины светящихся клеток также не наблюдали. Иммуногистохимический анализ показал отсутствие Human Anti-Nuclei – позитивных клеток в ткани печени. На криосрезах присутствовало только фоновое свечение, создаваемое используемыми антителами (антитела мыши) (рис. 2).

При трансплантации в селезенку клеток линии HepG2 на пятые сутки во всех долях печени под ультрафиолетом диффузно проявлялись области свечения, характерные для меченных Hoechst № 33342 клеток HepG2 (рис. 3). При этом наибольшая яркость свечения была выявлена в левой и правой долях, наименьшая в медиальной доле и в краевых зонах каудальной доли. Иммуногистохимический анализ фрагментов ткани печени также показал присутствие Human Anti-Nuclei – позитивных клеток, которые были расположены в паренхиме органа группами или одиночными клетками (рис. 4).

Нами было установлено, что внутриселезеночное введение обеспечивает попадание трансплан-

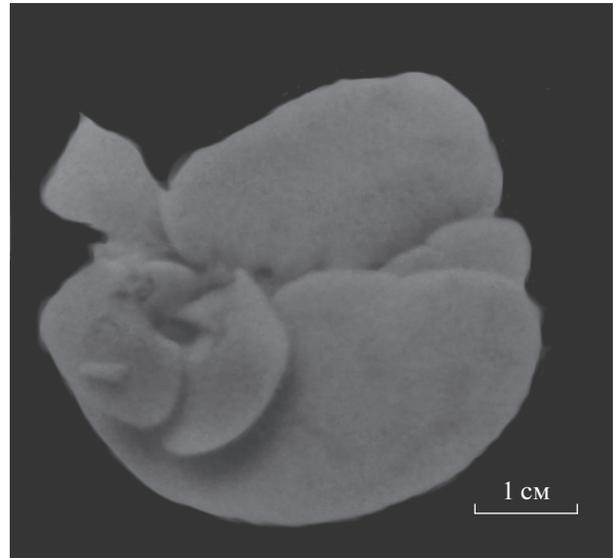


Рис. 1. Печень мыши под ультрафиолетом. Визуализация клеток линии гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2, окрашенных Hoechst № 33342. Ксенотенная внутрибрюшинная трансплантация.

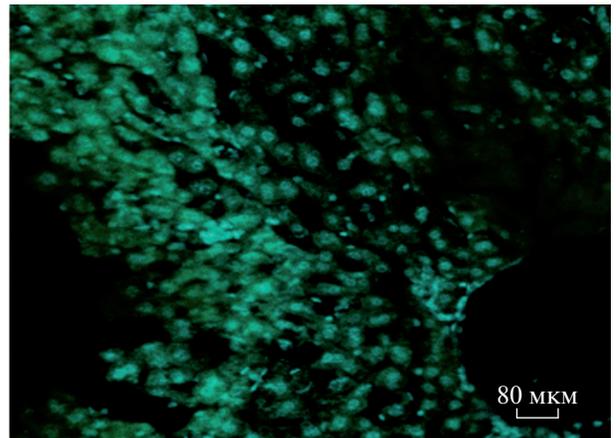


Рис. 2. Поперечный срез печени мыши. Иммуногистохимическое окрашивание с использованием Human Anti-Nuclei Alexa Fluor 488 (зеленый) и Hoechst № 33342 (голубой) – ядра клеток. Ксенотенная внутрибрюшинная трансплантация.

тированных клеток в печень реципиента, тогда как в те же сроки при внутрибрюшинном введении трансплантируемые клетки в ткани печени реципиента не обнаруживаются, так же, как и в ткани вблизи места инъекции. Таким образом, способ внутриселезеночного введения оказался эффективным и может быть предложен далее, как способ трансплантации клеток для репарации ткани печени.

Именно этот способ введения клеток и был использован нами в дальнейшем для выявления эффективности трансплантации МСК ЖТ в активи-

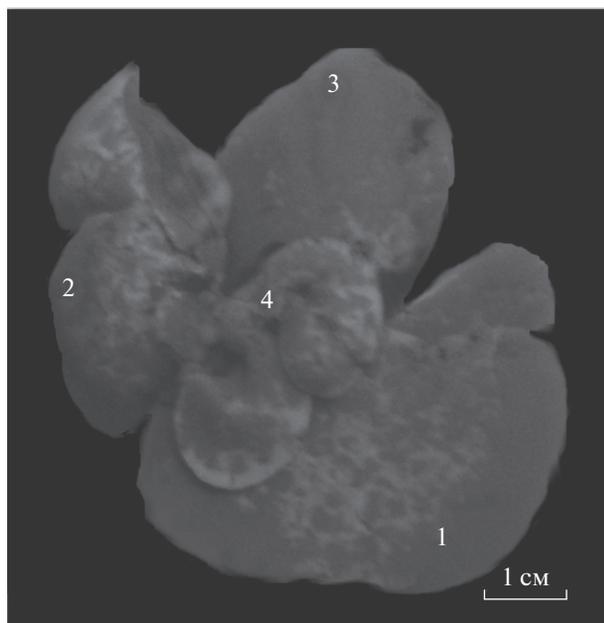


Рис. 3. Печень мыши под ультрафиолетом. Визуализация клеток линии гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2, окрашенных Hoechst № 33342. Ксеногенная трансплантация в селезенку. Области свечения трансплантированных клеток: 1 – левая доля, 2 – правая доля, 3 – медиальная доля, 4 – каудальная доля.

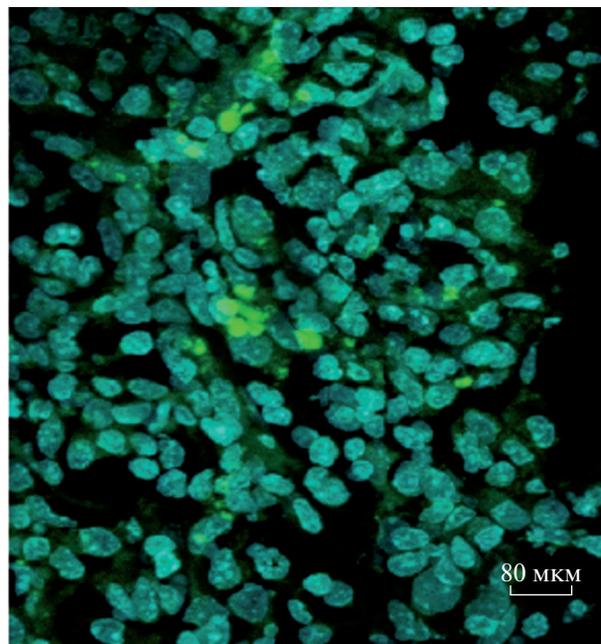


Рис. 4. Поперечный срез печени мыши. Иммуногистохимическое окрашивание с использованием Human Anti-Nuclei Alexa Fluor 488 (зеленый) – ядра HepG2 и Hoechst № 33342 (голубой) – ядра клеток. Ксеногенная трансплантация в селезенку.

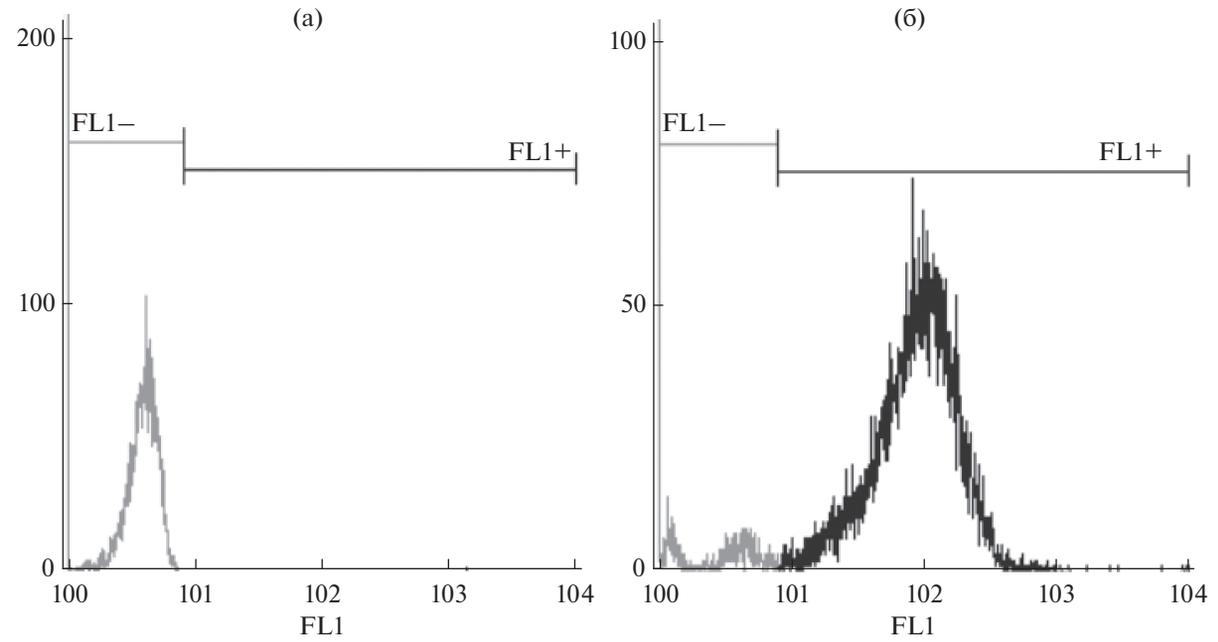
зации репаративных процессов в ткани печени мышей при индуцированном фиброзе.

Полученные нами МСК ЖТ мыши были охарактеризованы на наличие поверхностных характеристических маркеров с использованием метода проточной цитофлуориметрии. В популяции выделенных из жировой ткани клеток на 2–3 пассаже присутствуют 90.92% CD90⁺-клеток (рис. 5б) и 84.51% CD44⁺-клеток (рис. 5в). При этом только 0.6% клеток окрашиваются антителами к маркеру CD45 (рис. 5г), что можно считать фоновым уровнем, сопоставимым с контролем (рис. 5а). Таким образом, практически все клетки в популяции (>84%) можно отнести к МСК ЖТ.

Затем мы проконтролировали попадание трансплантированных внутриселезеночным способом аллогенных МСК ЖТ в печень реципиентов. Для визуализации их предварительно маркировали не только красителем Hoechst, но и мембранным красителем CellMask Deep Red Plasma membrane Stain. На 5 сутки после трансплантации в селезенку просмотр печени реципиента под ультрафиолетом выявил наличие областей свечения, расположенных по периферии долей. Следует отметить, что локализация свечения отличалась от таковой при трансплантации клеток HepG2. Кроме этого, и интенсивность свечения при трансплантации МСК ЖТ была значительно ниже, чем при трансплантации HepG2 (рис. 6).

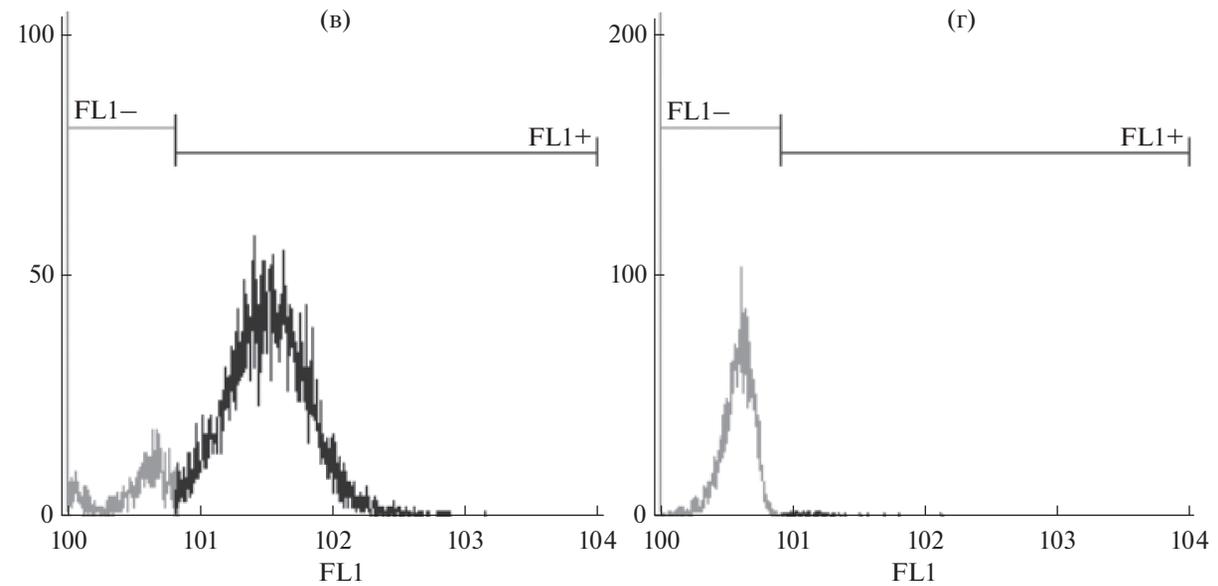
Флуоресцентный анализ срезов ткани печени реципиента после трансплантации МСК ЖТ выявил наличие лишь единичных клеток, маркированных мембранным красителем, в паренхиме органа (рис. 7), в отличие от множественных трансплантированных клеток HepG2. На наш взгляд, одним из ключевых моментов, позволяющим объяснить такое различие, может быть принадлежность клеток линии HepG2 к тому же гистотипическому ряду (клетки гепатоцеллюлярной карциномы), что и орган-мишень. Местом их начальной локализации является печень, поэтому они проявляют большее сродство к ней. Области же локализации МСК ЖТ в организме многообразны. Таким образом, можно полагать, что предварительное направление дифференцировки с учетом гистотипичности способствует преимущественному попаданию трансплантированных клеток в орган-мишень реципиента.

Эффективность трансплантации МСК ЖТ для репарации поврежденной печени при индуцированном фиброзе оценивали через 14 суток после введения. На момент трансплантации гистологическая картина ткани печени показывала наличие септ, распространяющихся в порто-портальном направлении, нарушение балочного строения, которое характеризовалось увеличением расстояния между балками и наличием эритроцитов в синусоидных капиллярах, что соответствовало индексу 2.5–3.0 по шкале METAVIR



Region	FL1 Mean	FL1 HPCV	FL1 CV	Count	Pct Total
FL1-	2.50	0%	66.22%	9999	99.99%
FL1+	1370.0	1.53%	0.00%	1	0.01%

Region	FL1 Mean	FL1 HPCV	FL1 CV	Count	Pct Total
FL1-	2.63	0%	72.46%	908	9.08%
FL1+	114.7	14.41%	198.40%	9092	90.92%



Region	FL1 Mean	FL1 HPCV	FL1 CV	Count	Pct Total
FL1-	2.92	0%	62.00%	1549	15.49%
FL1+	43.2	6.88%	102.81%	8451	84.51%

Region	FL1 Mean	FL1 HPCV	FL1 CV	Count	Pct Total
FL1-	2.92	0%	62.00%	1549	15.49%
FL1+	43.2	6.88%	102.81%	8451	84.51%

Рис. 5. Анализ поверхностных маркеров МСК ЖТ мыши методом проточной цитофлуориметрии. (а) контрольный образец; (б) анализ распределения CD90⁺-клеток; (в) анализ распределения CD44⁺-клеток; (г) анализ распределения CD45⁺-клеток.

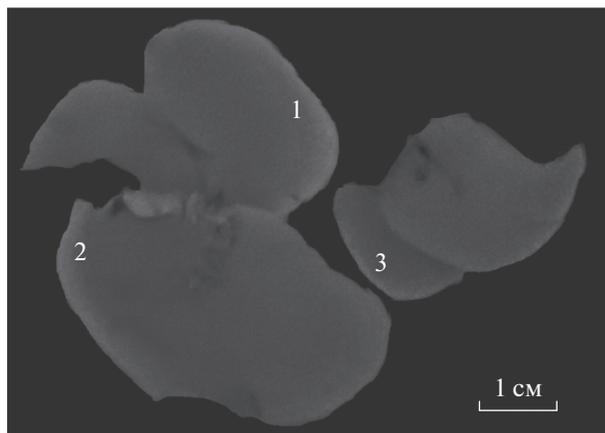


Рис. 6. Печень мыши под ультрафиолетом. Визуализация МСК ЖТ, окрашенных Hoechst № 33342 (зоны 1, 2, 3). Аллогенная трансплантация в селезенку.

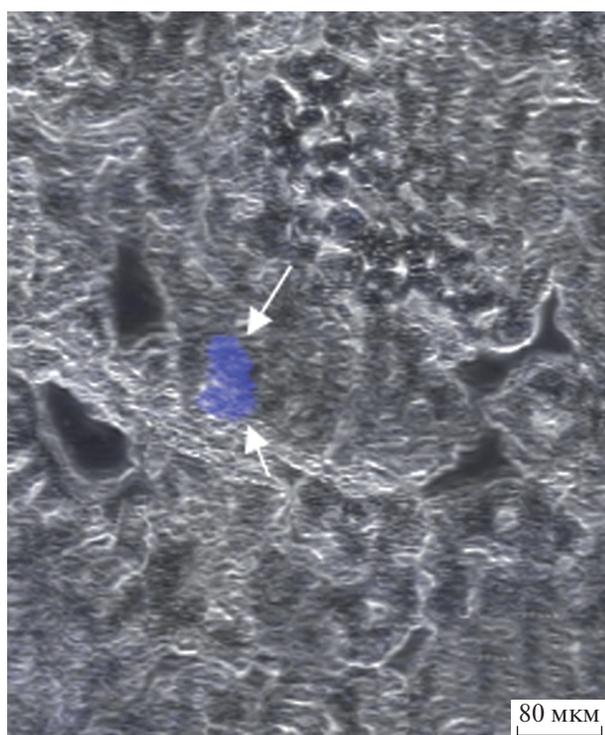


Рис. 7. Поперечный срез печени мыши. Окрашивание МСК ЖТ с использованием CellMask Deep Red Plasma membrane Stain. Аллогенная трансплантация в селезенку.

(рис. 8). Через 14 суток после трансплантации в печени мышей из контрольной группы индуцированного фиброза (без введения клеток) происходит естественная регрессия фибротических изменений, хотя сохраняется наличие порто-портальных септ, отмечены признаки различных типов дистрофий, что соответствует индексу 2.0–2.5 по шкале METAVIR (рис. 9). В группе мышей

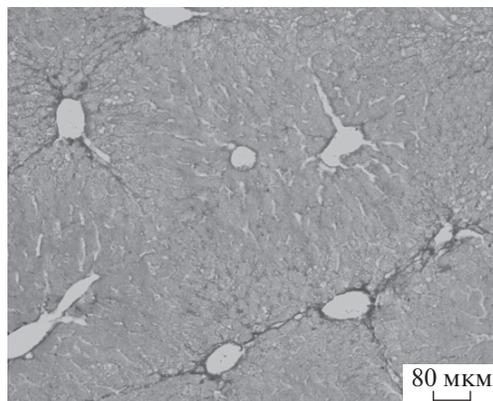


Рис. 8. Поперечный срез печени мыши. Индуцированный фиброз 3.5 недели. Окраска по сложному многокрасочному методу Маллори.

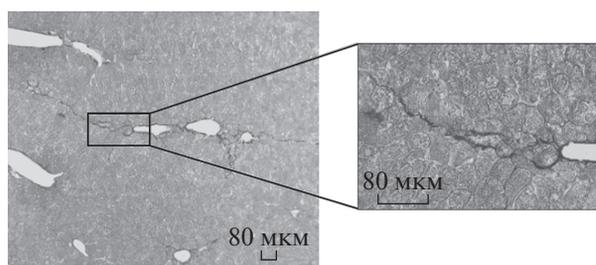


Рис. 9. Поперечный срез печени мыши. 14 сут после окончания инъекций CCl_4 в отсутствие трансплантации МСК ЖТ. Окраска сложным многокрасочным методом Маллори.

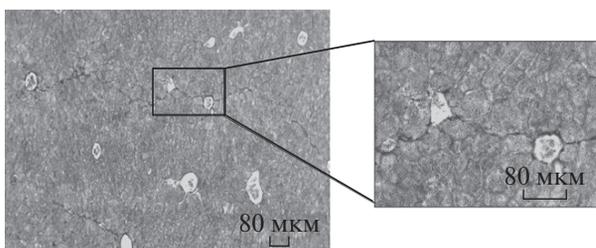


Рис. 10. Поперечный срез печени мыши. 14 сут после окончания трансплантации МСК ЖТ. Окраска сложным многокрасочным методом Маллори.

с индуцированным фиброзом, которым трансплантировали МСК ЖТ, в то же время наблюдали снижение коллагенизации, что выражается в наличии фрагментированных септ. Характер распространения данных септ отличен от такового в печени мышей группы CCl_4 . Однако на отдельных участках наблюдаются разные виды дистрофий гепатоцитов и присутствуют единичные не-

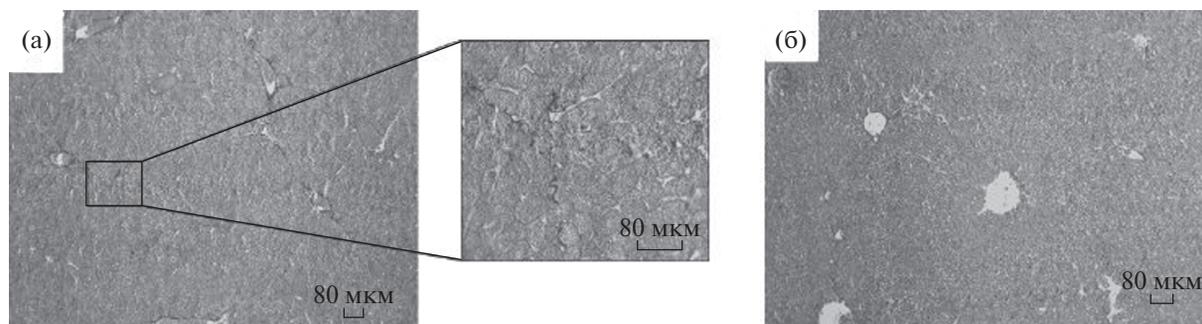


Рис. 11. Поперечный срез печени мыши. 14 сут после трансплантации МСК ЖТ, предварительно обработанных интерлейкином-6. Окраска сложным многокрасочным методом Маллори.

крозы тканей. Данная картина соответствует индексу 1.5–2.0 по шкале METAVIR (рис. 10). Таким образом, можно предполагать, что при трансплантации МСК ЖТ происходит снижение (хоть и незначительное) степени фибротических изменений ткани печени.

В группе мышей с индуцированным фиброзом, которым трансплантировали МСК ЖТ, предварительно обработанных интерлейкином-6, в те же сроки после трансплантации выявили существенное снижение коллагенизации ткани (рис. 11, рис. 12), видны единичные фрагментированные септы, практически отсутствуют различные дистрофии гепатоцитов. При анализе серийных срезов были отмечены обширные участки паренхимы печени, структура которых была сопоставима с контролем: полное отсутствие коллагенизации ткани. Этого не было отмечено в группе мышей, где проводили трансплантацию “чистых” МСК ЖТ. Тенденция к повышению эффективности трансплантации МСК ЖТ, предварительно обработанных интерлейкином, может быть напрямую связана с действием самого интерлейкина: IL-6 является цитокином, который участвует в воспалительных реакциях, иммунной регуляции, уменьшает процент апоптоза

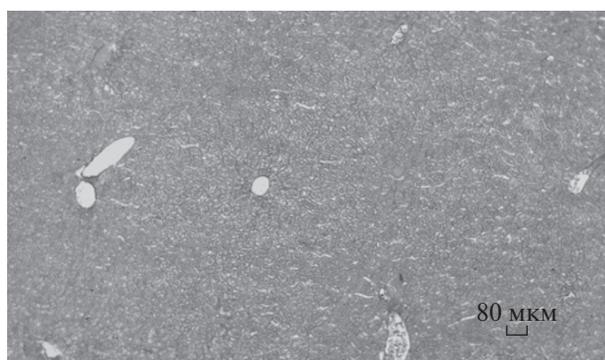


Рис. 12. Поперечный срез печени мыши. Контрольная группа. Окраска сложным многокрасочным методом Маллори.

гепатоцитов при фиброзе печени. И как было показано на культурах гепатоцитов, он оказывает положительный эффект на пролиферацию и синтез ДНК. Кроме того, в некоторых работах указаны антиоксидантные свойства IL-6 при фибротических изменениях (Nasir et al., 2013).

Таким образом, проведенное исследование наметило дальнейшие пути повышения эффективности использования методов и способов клеточных технологий для репарации токсических повреждений печени.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-50-00029). В работе были использованы клеточные линии Коллекции клеточных культур Центра коллективного пользования ФГБУ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Калинина Н.И.* Мезенхимальные стволовые клетки в процессах роста и репарации тканей // *Acta Naturae*. 2011. № 4.
- Курышева М.А.* Фиброз печени: прошлое, настоящее и будущее // *Регулярные выпуски “РМЖ”*. 2010. № 28. С. 1713.
- Налобин Д.С., Супруненко Е.А., Голиченков В.А.* Влияние мелатонина на дифференцировочный потенциал клеток Ито при индуцированном фиброзе печени мыши // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2016. Т. 161. № 6. С. 807–812.
- Петракова О.С., Черногло Е.С., Терских В.В. и др.* Использование клеточных технологий в лечении патологий печени // *Acta Naturae*. 2012. Т. 4. № 3 (14). С. 81–96.
- Carvalho A.B., Quintanilha L.F., Dias J.V. et al.* Bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells do not reduce fibrosis or improve function in a rat model of severe chronic liver injury // *Stem Cells*. 2008. V. 26. P. 1307–1314.
- Fujii T., Fuchs B.C., Yamada S. et al.* Mouse model of carbon tetrachloride induced liver fibrosis: Histopathological changes and expression of CD133 and epidermal growth factor // *BMC Gastroenterol*. 2010. V. 10. P. 79.

- Liedtke Chr., Luedde T., Sauerbruch T. et al.* Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects // *Fibrogenesis & Tissue Repair*. 2013. V. 6. № 19. P. 1–24.
- Michalopoulos G.K.* Liver regeneration // *J. Cell Physiol*. 2007. V. 213. P. 286–300.
- Nasir G.A., Mohsin S., Khan M. et al.* Mesenchymal stem cells and interleukin-6 attenuate liver fibrosis in mice // *Journal of Translational Medicine*. 2013. V. 11. P. 78.
- Ohashi K., Park F., Kay M.A.* Hepatocyte transplantation: clinical and experimental application // *J. Mol. Med*. 2001. V. 79. P. 617–630.
- Okura H., Soeda M., Morita M. et al.* Therapeutic potential of human adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells in liver fibrosis // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2015. V. 456. P. 860–865.
- Yanger Kilangungla.* Cellular mechanisms of mammalian liver regeneration // *Publicly Accessible Penn. Dissertations*. 2013. P. 949.
- Zorn A.M.* Liver development [электронный ресурс] // *StemBook, The Stem Cell Research Community*. 2008.

Efficiency of Cell Transplantation in Repair of Mouse Liver Damage

E. S. Korobko^{a,*}, E. A. Suprunenko^{a,**}, and A. V. Vasil'ev^{a,b}

^a*Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*

^b*Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia*

**e-mail: katekorobko@gmail.com*

***e-mail: suprunenkoe@mail.ru*

The effectiveness of two transplantation methods of human hepatocellular carcinoma cells HepG2 and allogeneic mesenchymal stromal cells of adipose tissue (AT MSCs) into mice was compared in order to select the most effective for liver damage repair. Considerable advantage of cell transplantation into the spleen compared with intraperitoneal administration was shown. It is found that, under similar conditions of transplantation, AT MSCs are detected in liver tissue in smaller quantities than human hepatocellular carcinoma cells HepG2; differences in cell localization of these types of cells in the liver are revealed. A tendency to decrease in the degree of fibrotic changes in liver tissue after transplantation of AT MSCs and to a greater extent after transplantation of AT MSCs, pretreated with interleukin-6, was traced.

Keywords: liver, cell transplantation, hepatic fibrosis, adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells