

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЛЕЧЕБНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ ОСТРОМ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ

Трапезникова Е.Г.¹, Шилов В.В.²

¹ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663, Ленинградская область, Всеволожский район, г.п.

Кузьмоловский, корп.93, Россия

²ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.

Мечникова Минздрава России, 191015, г. Санкт-Петербург, Кирочная улица д. 41

niigrech@rihophe.ru

Резюме. В настоящее время терапия заболеваний гепатобилиарной системы токсического генеза является одной из сложных проблем современной медицины. В патогенезе токсических поражений ведущую роль занимают острые гепатиты. Несмотря на имеющийся широкий спектр терапевтических мероприятий и фармакологических схем применяемых для лечения токсических поражений печени, существует высокий риск инвалидизации и смертности пациентов, в связи с непредсказуемостью течения воспалительного процесса, а также несовершенством применяемых подходов.

Внедрение методов трансплантации стволовых клеток в клиническую практику позволило открыть принципиально новый подход в лечении многих заболеваний. В токсикологической практике методы регенеративной медицины в настоящее время не нашли широкого применения, хотя в некоторых областях медицины именно данный метод является одним из эффективных. С целью расширения использования клеточных технологий в медицине, необходимы экспериментальные и клинические исследования с целью определения безопасности и эффективности трансплантации стволовых клеток при заболеваниях, возникших по причине воздействия на организм различных токсикантов, по результатам которых можно будет определить перспективы их дальнейшего использования в данной области.

Цель исследования – экспериментальная оценка лечебной эффективности мезенхимальных стволовых клеток при остром токсическом гепатите у крыс.

Для моделирования острого токсического гепатита у белых беспородных крыс проводили однократное внутривенное введение четыреххлористого углерода в дозе 1500 мг/кг. Культура мезенхимальных стволовых клеток для внутривенной трансплантации была получена из эмбриональных стволовых клеток мыши путем направленной дифференцировки. Для изучения распределения мезенхимальных стволовых клеток в

организме крыс перед внутривенной инъекцией проводили окрашивание мембран клеток флуоресцентным красителем РКН-26. Концентрация трансплантированных мезенхимальных стволовых клеток составила 2×10^6 на животного.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что трансплантация мезенхимальных стволовых клеток интактным крысам не вызывала внешних признаков интоксикации и не приводила к гибели животных на все сроки наблюдения. После инъекции суспензии ММСК на фоне индуцированного острого токсического гепатита наблюдалось снижение смертности животных. Изучение распределения мезенхимальных стволовых клеток в организме крыс после их системного введения, показало, что трансплантированные клетки обнаруживались в ткани печени на 3-и и все последующие сроки наблюдения. Данный факт доказывает миграцию трансплантированных мезенхимальных стволовых клеток непосредственно поврежденный орган, а также указывает на безопасность проведенной процедуры.

Ключевые слова: регенеративная медицина; экспериментальное исследование; острый токсический гепатит; мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки; распределение; выживаемость

**EXPERIMENTAL EVALUATION OF THE TREATMENT EFFECTIVENESS OF
MESENCHYMAL STEM CELLS IN ACUTE TOXIC HEPATITIS**

¹ Trapeznikova E.G., ² Shilov V.V.

¹*Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology Federal State Unitary Enterprise, Federal Medical Biological Agency, G/P Kuzmolovsky, Vsevolozhsky District, Leningrad Region, 188663, Russian Federation*

²*North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, 191015, Sankt-Petersburg, Russian Federation*
niigpech@rihophe.ru

Abstract. Currently, the treatment of diseases of the hepatobiliary system of toxic origin is one of the most difficult problems of modern medicine. Acute hepatitis plays a leading role in the pathogenesis of toxic lesions. Despite the wide range of therapeutic measures and pharmacological schemes used to treat toxic liver damage, there is a high risk of disability and mortality in patients due to the unpredictability of the course of the inflammatory process, as well as the imperfection of the approaches used.

The introduction of stem cell transplantation into clinical practice has made it possible to discover a fundamentally new approach to the treatment of many diseases. In toxicological practice, the methods of regenerative medicine are not currently widely used, although in some areas of medicine this method is one of the most effective. In order to expand the use of cellular technologies in medicine, experimental and clinical studies are needed to determine the safety and effectiveness of stem cell transplantation in diseases caused by exposure to various toxicants, the results of which will determine the prospects for their further use in this field.

The purpose of the study was to experimentally evaluate the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells in acute toxic hepatitis in rats.

To simulate acute toxic hepatitis in outbred rats, a single intragastric administration of carbon tetrachloride at a dose of 1500 mg/kg was performed. The culture of mesenchymal stem cells for intravenous transplantation was obtained from mouse embryonic stem cells by directed differentiation. To study the distribution of mesenchymal stem cells in the body of rats, before intravenous injection, cell membranes were stained with fluorescent dye RKH-26. The concentration of transplanted mesenchymal stem cells was 2×10^6 per animal.

The results of the study indicate that MMSC transplantation to intact rats did not cause external signs of intoxication and did not lead to the death of animals for all periods of observation. After injection of mesenchymal stem cells suspension against the background of induced acute toxic hepatitis, a decrease in animal mortality was observed. The study of the distribution of

mesenchymal stem cells in the body of rats after their systemic administration showed that the transplanted cells were found in the liver tissue on the 3rd and all subsequent periods of observation. This fact proves the migration of transplanted mesenchymal stem cells directly to the damaged organ, and also indicates the safety of the procedure.

Keywords: regenerative medicine; pilot study; acute toxic hepatitis; multipotent mesenchymal stem cells; distribution; survival

Введение. Одну из лидирующих позиций в структуре заболеваемости токсической этиологии занимают острые гепатиты. Данная патология чаще всего встречается в группе взрослого трудоспособного населения, что обусловлено влиянием на организм широкого спектра химических веществ, обладающих гепатотоксическими свойствами. Одними из превалирующих этиологических факторов, способных вызывать токсическое поражение печени, являются производственные факторы, а также прием лекарственных, наркотических средств и спиртосодержащей продукции [1, 2].

Ожидается, что из-за высокой частоты приема полимедикаментов и пищевых добавок, ухудшением экологической обстановки, демографических изменений с растущим старением и общей заболеваемостью населения, количество заболеваний печени токсической этиологии в будущем будет только расти [3, 4].

В последние годы наблюдается существенный прогресс в области разработок новых средств и методов для терапии многих заболеваний, данная тенденция, прежде всего, обусловлена несовершенством имеющихся методов, а также появлением новых технологий, позволяющих открывать новые более эффективные подходы в лечении [5, 6]. Открытие стволовых клеток и изучение их свойств позволили разработать методики их терапевтического применения. Уже сейчас трансплантация стволовых клеток из экспериментальных исследований перешла в клиническое применение и широко используется для лечения целого ряда заболеваний [7, 8, 9]. Этому способствует подтверждение профиля безопасности стволовых клеток, а также объем данных, который свидетельствует об эффективности их использования для восстановления структурных и функциональных повреждений органов и тканей. Но остаются области медицины, в которых применение стволовых клеток еще не так широко представлено, в частности в токсикологии.

Таким образом, частота и тяжесть токсического повреждения печени обуславливает поиск новых подходов в лечении данных заболеваний с целью предотвращения развития состояний, угрожающих жизни пациентов.

Цель исследования - экспериментальная оценка лечебной эффективности мезенхимальных стволовых клеток при остром токсическом гепатите у крыс.

Материалы и методы. В работе использовали половозрелых белых беспородных крыс самцов, полученных из питомника «Рапполово» (Ленинградская область). Всех животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к пище и воде. Опыты были выполнены в соответствии с международными биоэтическими нормами (Директива Европейского Сообщества от 24 ноября 1986 г. – 86/609/ЕЕС).

Для создания экспериментальной модели острого токсического гепатита у крыс использовали однократное внутрижелудочное введение масляного раствора четыреххлористого углерода CCl_4 («ЛенРеактив», Россия) в дозе 1500 мг/кг.

Популяция мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) были получена путем направленной дифференцировки из эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) мышей линии C57Bl/СВА. Для дифференцировки ЭСК в мезенхимальный тип проводили культивирование клеток в бесфидерной системе – в чашках Петри 60 мм, покрытых 0,1 % желатиной при 37°C в мультигазовом инкубаторе MCO-18M («Sanyo», Япония) с низким содержанием O_2 (не более 5 %), влажностью 95 %. Для культивирования ЭСК мыши применяли ростовую среду следующего состава: нокаутная среда ДМЕМ («Gibco», США) с добавлением 15 % нокаутной сыворотки для ES («Invitrogen», США), 0,1 мМ β -меркаптоэтанола, 1 % незаменимых аминокислот (NEAA), 2 мМ L-глутамина, антибиотики (пенициллин 100 ед/мл, стрептомицин 10 мг/мл), LIF 10 нг/мл. Смену среды проводили по мере роста колоний. Через 4-6 дней после увеличения размеров колоний культуру механически выделяли и переносили на свежий фидер в соотношении 1:6.

Недифференцированные ЭСК энзиматически снимали с подложки, диссоциировали до единичных клеток, пассировали на неадгезивную поверхность при отсутствии фактора LIF. Культивирование клеток проводили при тех же условиях, что и ЭСК. Клеточную суспензию в концентрации по 500-600 клеток в капле (30 мкл) наносили на гидрофобную поверхность чашки 100 мм и культивировали пять дней. На 5-е сутки, когда сферические конгломераты увеличились в размерах, капли объединяли и переносили в культуральные чашки, покрытые желатиной. Культивировали несколько пассажей до получения стабильной однородной популяции мезенхимальных клеток (5-6 пассаж).

Для изучения распределения ММСК в организме крыс непосредственно перед внутривенной трансплантацией культуру клеток окрашивали флуоресцентным витальным красителем РКН-26 («Sigma», США). Для окрашивания флуорохромом РКН-26 ММСК снимали с чашек с помощью трипсина и ЭДТА, промывали раствором PBS и на 10 минут помещали в раствор РКН-26 (из расчета 2×10^{-6} М вещества на 1×10^7 кл/мл). Окрашенные клетки отмывали в PBS с конечными концентрацией 4×10^6 клеток в 1 мл. Эффективность окрашивания клеток оценивали с помощью флуоресцентного микроскопа («Nicon», Япония). Детекцию свечения меченных РКН-26 клеток осуществляли при длине волны 567 нм.

Полученную культуру ММСК в дальнейшем использовали для внутривенной трансплантации белым беспородным крысам с индуцированным острым токсическим гепатитом.

Для изучения лечебной эффективности трансплантированных ММСК, животные были распределены на 4 группы (n=134):

- 1 группу составляли контрольные животные (n=15);
- животным 2 группы в хвостовую вену вводили однократно суспензию ММСК в объеме 500 мкл, содержащую 2×10^6 клеток (n=20).
- животным 3 группы (позитивный контроль – ПК) проводили однократное внутрижелудочное введение масляного раствора CCl_4 в дозе 1500 мг/кг (n=41);
- 4 группу составляли животные, которым однократно внутрижелудочно вводили CCl_4 в дозе 1500 мг/кг и через 5 часов после этого проводили внутривенную трансплантацию суспензии ММСК в объеме 500 мкл, содержащую клетки в концентрации 2×10^6 (n=58).

Наблюдение за животными проводили в течение 7-и дней после воздействия четыреххлористого углерода и трансплантации ММСК. Забор органов и тканей у крыс для изучения распределения трансплантированных ММСК проводили на 1-е, 3-и, 5-е и 7-е сутки. Эвтаназия животных осуществлялась путем декапитации, после легкого эфирного наркоза.

Изучение распределения предварительно флуоресцентно меченных ММСК (РКН-26) в срезах органов и тканях крыс после трансплантации проводили с помощью флуоресцентного микроскопа на гистологических криопрепаратах изготовленных на криостатном микротоме Tissue-Tek Cryo3 («Sakura», Япония). Анализ гистологических срезов проводили с помощью микроскопа Axioskop-40 («Carl Zeiss», Германия) и цветной цифровой фотокамерой ProgRes CFscan («Carl Zeiss», Германия).

Статистический анализ полученных результатов проводился с помощью пакета программ Microsoft office Excel 2013, Graph Prism 5.04. Для оценки характера распределения выборки использовали тест Колмогорова-Смирнова. Долю выживаемости животных всех групп рассчитывали по *F*-критерию Фишера. Статистически значимым считалось различие между группами при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение. При однократном введении CCl_4 в дозе 1500 мг/кг у крыс в течение первого часа наблюдали клиническую картину интоксикации. Спустя 2-3 часа после введения CCl_4 симптомы интоксикации нарастали, животные находились в заторможенном состоянии, передвижение по клетке было ограничено, наблюдалось вынужденное положение, глаза закрыты. У части животных регистрировалась шаткая походка и слабая реакция на внешние раздражители. Отмеченные симптомы сохранялись в течение 36-48 часов. В последующие сроки наблюдения активность выживших животных возрастала.

Случаи смертельного исхода у крыс группы позитивного контроля (3 гр.) наблюдались на протяжении 5-и суток, в группе животных, при трансплантации ММСК (4

гр.) в течение 2-х суток. В группе позитивного контроля наибольшая гибель животных приходилась на 2-е сутки, в группе животных после воздействия CCl_4 и последующей трансплантации ММСК – в 1-е сутки эксперимента. За весь период эксперимента в группе ПК процент гибели составил 43,9 % (18 случаев), в группе животных с трансплантацией ММСК 15,51 % (9 случаев), $p=0,0027$, F- критерий (таблица).

Таблица

Динамика выживаемости белых беспородных крыс при остром отравлении четыреххлористым углеродом в дозе 1500 мг/кг и трансплантации ММСК

Группы (n=149)	Сроки/Кол-во погибших животных (абс.число)					Общее количество погибших за все время эксперимента, абс. число, (%)	Процент выживших животных
	1 сутки	2 сутки	3 сутки	5 сутки	7 сутки		
1 гр., контроль, (n=15)	0	0	0	0	0	0 (0)	100 %
2 гр., в/в ММСК, (n=20)	0	0	0	0	0	0 (0)	100 %
3 гр., (ПК), в/ж CCl_4 , (n=41)	5	11	1	1	0	18 (43,90 %)	56,1 %
4 гр., в/ж CCl_4 + в/в ММСК, (n=58)	6	3	0	0	0	9 (15,51 %**)	84,49 %** ($p=0,0027$)

Примечания: ** – достоверность различий ($p \leq 0,01$) между 3 и 4 группой.

При макроскопическом исследовании органов и тканей у животных 3 и 4 групп на всех сроках исследования было выявлено увеличение печени, рисунок органа пестрый по типу «мускатной печени», ткань органа уплотнена, края закруглены.

По данным гистологического исследования, однократное внутрижелудочное введение CCl_4 крысам в дозе 1500 мг/кг приводило к морфологической картине острого токсического гепатита. На 1-е сутки исследования наблюдались обширные некрозы центрлобулярных отделов печени, которые в последующие сроки исследования замещались лимфогистиоцитарными инфильтратами. Выявлены гистологические признаки нарушения жирового, углеводного и белкового обменов, которые сохранялись до 7-и суток исследования.

При анализе гистологических срезов печени у животных, которым проводили трансплантацию ММСК (2 и 4 группа) на 1-е сутки исследования наблюдали аутофлуоресценцию, прямых данных за наличие ММСК в паренхиме печени на данный срок наблюдения выявлено не было. Флуоресцентный сигнал на заданной длине волны исходил только от гистологических срезов печени на 3-и, 5-е и 7-е сутки исследования (Рисунок).

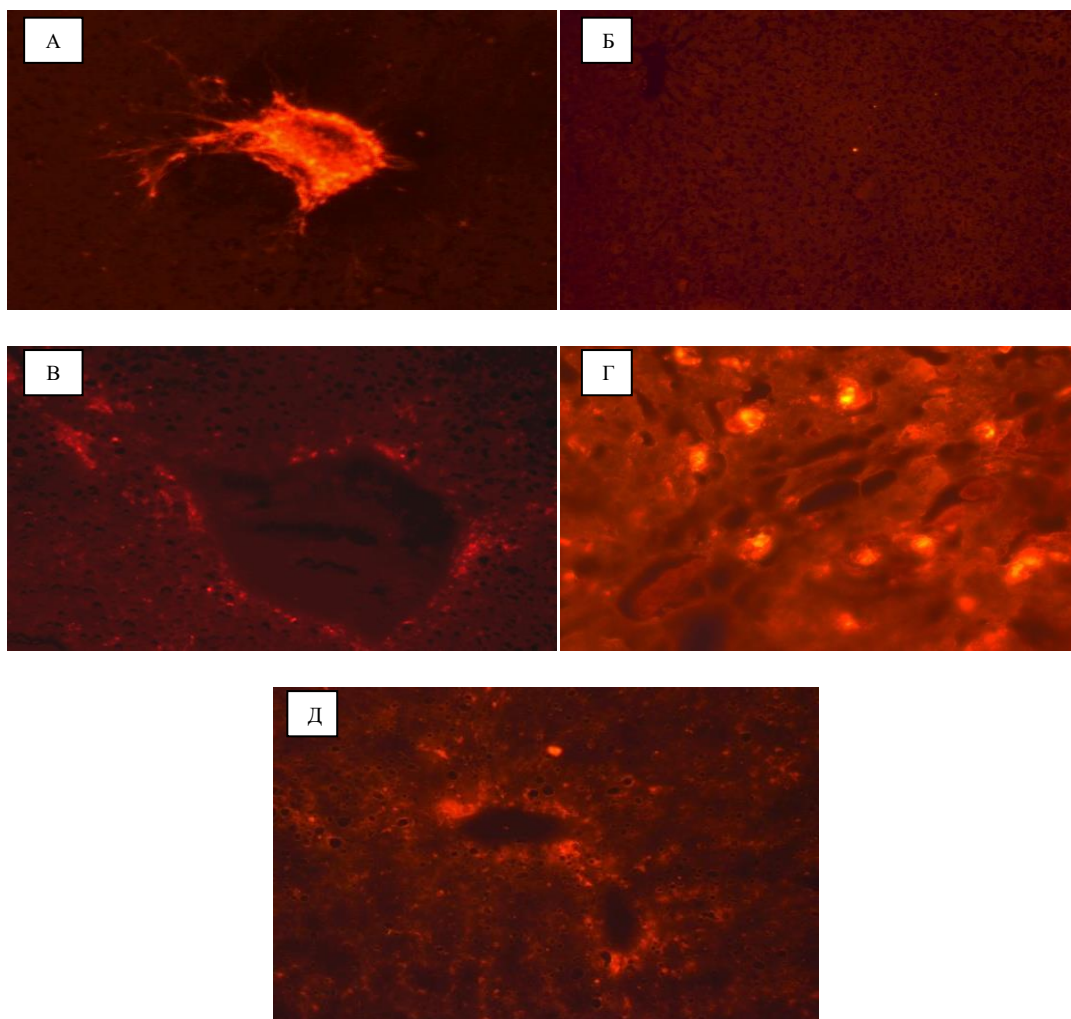


Рисунок – Идентификация ММСК в гистологических срезах печени крыс с использованием иммунофлуоресцентных методов

Примечание: А – ММСК окрашенные РКН-26 перед внутривенной трансплантацией, ув.×63;

Б – контроль, печень, ув. ×10; В – 3 сутки исследования, флуоресцентные ММСК расположены вокруг централобулярных зон печени крыс, ув. ×20; Г – 5 сутки исследования, флуоресцентные ММСК расположены в синусоидах печени, ув.×63;

Д – 7 сутки исследования, ММСК в централобулярных отделах печени.

Максимальное количество клеток на гистологических препаратах печени было выявлено на 3-и сутки исследования, к 5-м и 7-м суткам отмечалось некоторое уменьшение количества флуоресцирующих ММСК расположенных вокруг централобулярных зон. Изучение распределения ММСК в печени показало, что трансплантированные клетки располагались в синусоидах поврежденных зон. Флуоресцентно-негативными оставались головной мозг, почки, сердце, мышцы, селезенка на все сроки исследования.

Таким образом, изучение распределения мезенхимальных стволовых клеток методом флуоресцентной микроскопии показало, что что внутривенно трансплантированные ММСК обнаруживались в печени крыс, начиная с 3-х суток непосредственно в синусоидах поврежденных зон печени. Расположение ММСК в синусоидах печени крыс является выгодным с точки зрения того, что клетки способны контактировать как с клетками печени, стимулируя их регенерацию, так и с портальной кровью, выделяя специальные биологически

активные вещества, влияющие на весь организм в целом. При этом на последующие сроки исследования (5-е и 7-е сутки) ММСК продолжали идентифицироваться в центрлобулярных зонах печени, но их количество на данные сроки уменьшалось по сравнению с 3-ми сутками.

Повышение выживаемости у животных 4 группы можно объяснить системным влиянием на организм внутривенно трансплантированных ММСК, которые секретируют биологически активные вещества, способствующие уменьшению интоксикации после воздействия CCl_4 .

Большое количество исследований продемонстрировало, что ММСК проявляют плейотропные эффекты, которые наделяют их огромным терапевтическим потенциалом. Попад в поврежденный участок, ММСК способствуют восстановлению структуры и функции органов и тканей посредством активации нескольких механизмов. В ответ на сигналы от поврежденных органов ММСК секретируют различные медиаторы восстановления тканей, в том числе антиапоптотические, противовоспалительные, иммуномодулирующие, антифиброзные и ангиогенные агенты [10]. ММСК высвобождают растворимые факторы, такие как трансформирующий фактор роста β (TGF β), индоламин-2,3-диоксигеназа (IDO), фактор некроза опухоли α (TNF α), интерлейкин 10 и интерферон гамма (INF γ) [11, 12]. Секретируемые ММСК соединения могут ингибировать патологические процессы, предотвращая гибель клеток, стимулировать ангиогенез, регулировать иммунный ответ организма, а также уменьшать интоксикацию, возникшую при воздействии токсических факторов.

Результаты нашего исследования свидетельствуют о том, что трансплантация мезенхимальных стволовых клеток может стать перспективным методом для терапии токсических поражений органов и тканей.

Выводы:

Трансплантация ММСК интактным животным не вызывает поведенческих и внешних признаков интоксикации.

Трансплантация ММСК оказывает детоксикационный эффект при индуцированном остром токсическом гепатите у белых беспородных крыс, что проявляется в повышении выживаемости животных на 28,4 %.

Внутривенно трансплантированные ММСК обнаруживаются в ткани печени крыс после ее токсического повреждения на 3-и и все последующие сроки, преимущественно в наиболее поврежденных отделах.

Механизм детоксикационной эффективности трансплантации ММСК основан на паракринном влиянии циркулирующих в крови ММСК, которые секретируют биологически активные вещества, а уже после 3х суток заселяют ткань печени с целью восстановления структуры и функции поврежденного органа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Киржанова В.В. Состояние и деятельность наркологической службы в Российской Федерации в 2021 году. Аналитический обзор. М.: *ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Минздрава России*, 2022.
2. Stravitz R.T., Lee W.M. Acute liver failure. *Lancet*. 2019; 394: 869-881.
3. Estes C., Anstee Q.M., Arias-Loste M.T., et al. Modeling NAFLD disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016-2030. *J Hepatol*. 2018; 69(4):. 896-904.
4. Purnak T., Yilmaz Y. Liver disease and malnutrition. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2013; 27(4): P. 619-629.
5. Пронина Е.А., Попыхова Э.Б., Степанова Т.В., Иванов А.Н. Современные направления и перспективы развития регенеративной медицины. *Современные проблемы науки и образования*. 2019; 3.
6. Кончугова Т.В., Бобровницкий И.П., Орехова Э.М., Пузырева Г.А. Перспективы развития регенеративной физиотерапии. *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры*. 2014; 91(5): С.42-49.
7. Олефир Ю.В., Медуницын Н.В., Авдеева Ж.И. и др. Современные биологические/биотехнологические лекарственные препараты. Актуальные вопросы разработки и перспективы использования. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2016; 16(2): 67-77.

8. McLauchlan D., Robertson N.P. Stem cells in the treatment of central nervous system disease. *J. Neurol.* 2018; 265: 984-986.
9. Uccelli A., Laroni A., Freedman M.S. Mesenchymal stem cells for the treatment of multiple sclerosis and other neurological diseases. *Lancet Neurol*; 2011; 10: 649-656.
10. Escacena N., Quesada-Hernandez E., Capilla-Gonzalez V. et al. Bottlenecks in the efficient use of advanced therapy medicinal products based on mesenchymal stromal cells. *Stem Cells Int.* 2015.
11. Madrigal M., Rao K.S., Riordan N.H. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *J Transl Med.* 2014; 12: 260.
12. Mendez-Ferrer S., Michurina T.V., Ferraro F. et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature.* 2010; 466(7308): 829–834.