

между компартаментами. Этапы культивирования и дифференцировочные среды используют такие же, как и в протоколе направленной дифференцировки МСК.

*Определение эффективности гепатогенной дифференцировки.* В процессе и по окончании этапов дифференцировки состояние и морфологию клеточных культур оценивают с помощью световой инвертированной микроскопии. Для верификации дифференцировки МСК в гепатоцит-подобные клетки оценивают их способность синтезировать и накапливать гликоген, а также концентрацию мочевины в культуральной среде.

*Анализ экспрессии маркерных генов в культурах МСК.* Оценивается синтез специфических веществ и экспрессия генов, характерных для гепатоцит-подобных клеток: Альбумин (ALB), цитохром P-450 1A1 (Cyt1A1), фосфоенолпируват карбоксилаза (Carbox), цитокератин 18 (Krt18), цитокератин 19 (Krt19),  $\alpha$ -фетопротеин (AFP),  $\beta$ -актин (bActin), глицеральдегид 3-фосфат дегидрогеназа (GAPDH)

#### **Обсуждение**

Подготовка МСК перед трансплантацией при лечении хронических заболеваний печени включает выделение аутологичных МСК из жировой ткани, культивированию клеточной культуры в лабораторных условиях, а также гепатоцитарную дифференцировку МСК.

Критериями «готовности» культуры МСК являются: содержание МСК не менее  $10^6$  клеток в 1 мл; иммунофенотипическая характеристика CD90+, CD105+, CD13+, CD44+, CD 73+, CD 54+, CD 29+, CD9+, CD34-, CD45-, HLA-DR-; пассаж P1-P3 (не более 40 дней культивирования); стерильность культуры и отрицательный тест на инфекционные агенты (гепатит В, С, ВИЧ, сифилис, цитомегаловирус); жизнеспособность МСК не менее 95 %; положительные тесты на специфические для гепатоцитов маркеры по окончании дифференцировки.

#### **Заключение**

Проведенные испытания показали эффективность метода предтрансплантационной подготовки клеточной культуры МСК для лечения хронических заболеваний печени. Метод может применяться в лабораториях, сертифицированных для работы с культурами клеток. В последующем клеточные культуры могут быть трансплантированы пациентам с хроническими заболеваниями печени или подвергнуты криоконсервации с включением в фонд криобанка.

#### **ЛИТЕРАТУРА**

1. *Белякин, С. А.* Смертность от цирроза печени как индикатор уровня потребления алкоголя в популяции / С. А. Белякин, А. Н. Бобров // Вестник Российской военно-медицинской академии. — 2009. — Т. 3. — С. 189–194.
2. *Готье, С. В.* Трансплантация печени: современное состояние проблемы / С. В. Готье // Альманах Института хирургии имени А. В. Вишневского. — 2008. — Т. 3, № 3. — С. 9–17.
3. *Кирик, В. М.* Стволовые клетки из жировой ткани: основные характеристики и перспективы клинического применения в регенеративной медицине / В. М. Кирик, Г. М. Бутенко // Журн. АМН Украины. — 2010. — Т. 16, № 4. — С. 576–604.
4. *Яргин, С. В.* Стволовые клетки и клеточная терапия: на подступах к научному подходу / С. В. Яргин // Цитология. — 2010, Т. 52 (№ 11). — С. 918–920.
5. *Wu, X. B.* Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells / X. B. Wu, R. Tao // Hepatobiliary Pancreat Dis Int. — 2012 Aug 15. — № 11(4). — P. 360–371.

**УДК 616.36: 611.018.26: 602.9**

### **КЛЕТОЧНАЯ ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ПРИ ЦИРРОЗЕ ПЕЧЕНИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

**Скуратов А. Г., Лызиков А. Н., Петренев Д. Р., Осипов Б. Б.**

**Учреждение образования  
«Гомельский государственный медицинский университет»  
г. Гомель, Республика Беларусь**

#### **Введение**

Цирроз печени и связанная с ним печеночно-клеточная недостаточность остается серьезной проблемой. В Республике Беларусь смертность от цирроза печени составляет около 35 случаев на 100 тыс. населения. Паллиативные хирургические вмешательства

не позволяют существенно снизить летальность. Единственным эффективным методом лечения цирроза печени остается трансплантация печени. Однако из-за дефицита донорских органов и высоких экономических затрат для многих пациентов она становится недоступна. По данным ВОЗ, в мире выполняется только 10 % от необходимого количества трансплантаций [2].

Таким образом, необходимо разрабатывать альтернативные методы лечения цирроза печени. В последние два десятилетия огромное внимание ученых привлекают мезенхимальные стволовые клетки (МСК) из-за их потенциала к самообновлению и дифференцировке в различные типы соматических клеток, в том числе гепатоциты. Они становятся перспективным источником клеток для тканевой инженерии и регенерации печени [1].

### ***Цель работы***

Обоснование эффективности клеточной трансплантации при лечении цирроза печени в эксперименте.

### **Задачи настоящего этапа исследования:**

1. Моделирование цирроза печени в эксперименте.
2. Выделение и культивирование МСК.
3. Проведение направленной дифференцировки МСК в гепатоцитарном направлении.
4. Исследование миграции МСК при их введения в организм лабораторного животного с индуцированным циррозом печени.
5. Оценка морфологических изменений в цирротической печени после трансплантации МСК.

### ***Материалы и методы***

Моделирование цирроза печени у крыс линии Vistar проводили путем внутрибрюшинного введения 50 % раствора  $CCl_4$  на оливковом масле из расчета 1 мл на кг массы тела два раза в неделю. Вместо питья давали 10 % раствор этилового спирта.

По стандартной методике протокола проводили выделение и культивирование МСК из жировой ткани и костного мозга [3]. Для работы использовали МСК второго пассажа. Проводили дифференцировку МСК в гепатоцитарном направлении. МСК высаживали во флаконы и 6-луночные планшеты и инкубировали в средах, содержащих комбинации дифференцировочных ростовых факторов и изолированные гепатоциты.

Оценивали морфологию клеточных культур с помощью световой инвертированной микроскопии. Исследовали способность клеток синтезировать и накапливать гликоген при дифференцировке МСК в гепатоцит-подобные клетки, а также концентрацию мочевины в культуральной среде. Также исследовали экспрессию специфических для гепатоцитов генов.

Введение взвеси МСК в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл лабораторным животным производили путем внутривенного системного введения в хвостовую вену. Для изучения миграционной активности МСК после их трансплантации в организм лабораторных животных производили окрашивание МСК флуоресцентным красителем РКН 67. Для дополнительного контрастирования производили окраску ядер клеток пропидий йодидом (PI), дающим красное свечение. После трансплантации на 1-е и 5-е сутки животных выводили из эксперимента и производили флуоресцентную микроскопию криосрезов органов. Морфологию печени исследовали спустя 1 месяц после введения МСК.

### ***Результаты***

Цирроз печени постнекротического генеза развивался через 60 суток у большинства крыс. МСК, выделенные из костного мозга, обогащали на основе их способности прилипать к субстрату. При дифференцировке МСК в гепатоцитарном направлении на 1-м этапе через 24 ч наблюдали образование клеточных кластеров вокруг адгезированных к подложке элементов МСК. На 2-м этапе наблюдали активный рост клеток с изменением морфологии клеточных элементов. Клетки приобретали сначала веретенообразный фенотип, который затем сменялся полигональным с многочисленными выростами мембраны.

Наблюдали формирование «фокусов адгезии» в ячейках с дифференцировочной средой и с мембранными вставками, содержащими первичные гепатоциты. Эти структуры, предположительно, являются т.н. «эмбионидными телами», которые образуются при культивировании эмбриональных стволовых клеток. Было проведено окрашивание на гликоген для идентификации этих образований. Диффузное розовое окрашивание при проведении ШИК-реакции было выявлено для обнаруженных в культуре МСК образований (рисунок 1), похожее на гранулы гликогена, находящиеся в цитоплазме гепатоцитов.

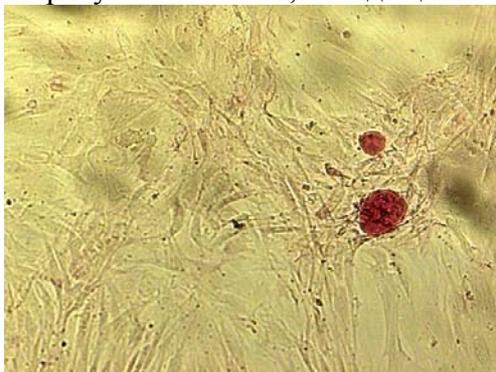


Рисунок 1 — Кластеры клеток с положительной реакцией на гликоген

Эти структуры, по нашему мнению, являются кластерами гепатоцит-подобных клеток, полученными из недифференцированных МСК и сохранившими контакт со стромой, сформированной из недифференцированных элементов. Также наблюдали повышение уровня продукции мочевины.

Изменения в профиле экспрессии маркерных генов (цитохром P-450 1A1 (Cyt1A1), фосфоенолпируват карбоксилаза (Carbox), цитокератин 18 (Krt18), цитокератин 19 (Krt19),  $\alpha$ -фетопроtein (AFP),  $\beta$ -актин (bAactin), глицеральдегид 3-фосфат дегидрогеназа (GAPDH) на протяжении этапов дифференцировки также свидетельствовали о присутствии в культуре МСК клеток, дифференцированных в гепатоцитарном направлении.

Анализируя изображения флуоресцентной микроскопии криосрезов органов крыс после трансплантации МСК было отмечено присутствие очагов яркой желто-зеленой флуоресценции размером с клетку на фоне аутофлуоресценции цитоплазмы клеток и флуоресценции ядер. Распространение этих очагов по различным органам отличалась. Наибольшее их число было отмечено в селезенке и в печени с индуцированным циррозом. Очаги преимущественно локализовались по ходу портальных трактов, вдоль септ, местами диффузно проникали в дольки. Имелась тенденция к увеличению плотности очагов от 1-х к 5-м суткам наблюдения (рисунок 2). В других органах, а также в здоровой печени в редких случаях отмечались единичные очаги яркой флуоресценции и случаи выявления сомнительно-положительных элементов.

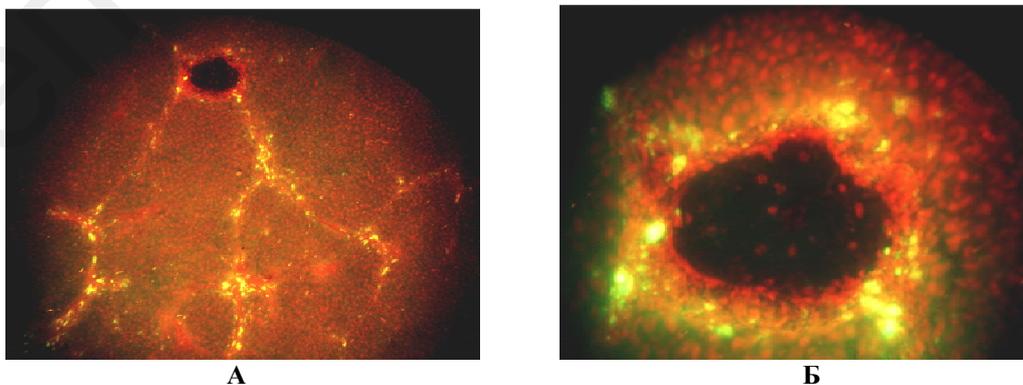
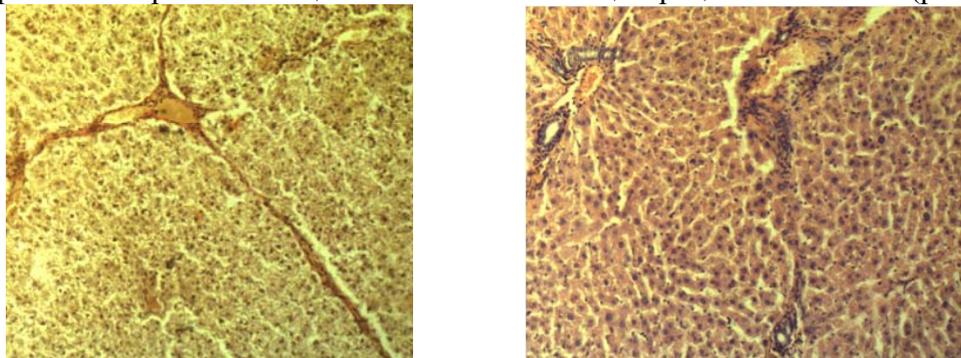


Рисунок 2 — Флуоресцентная микроскопия препарата цирротической печени (А), перипортальная локализация флуоресцентных меток (Б)

Была проведена сравнительная оценка морфологических изменений в цирротической печени крыс после трансплантации взвеси МСК в концентрации  $1 \times 10^6$  кл/мл (рисунок 3).



**А** **Б**  
Рисунок 3 — Микропрепарат ат печени крысы через 2 месяца после отмены тиаоацетамида (окраска Ван-Гизон,  $\times 40$ ) (А); микропрепарат печени крысы через 2 месяца после отмены тиаоацетамида и интрапортального введения МСК (окраска гематоксилин-эозин,  $\times 40$ ) (Б)

У контрольной крысы в печени отмечались крупно и мелкоклеточная жировая дистрофия, умеренно выраженный фиброз, полнокровие сосудов и стромы. В области триад имеется умеренно выраженная лимфоидная инфильтрация. Стадия фиброза по системе Metavir – F3.

После введения МСК фиброз отсутствовал, пылевидная дистрофия гепатоцитов, появление высокой клеточности в соединительной ткани стромы. Стадия фиброза по системе Metavir – F0.

#### **Заключение**

1. Наблюдаемые изменения в фенотипе и в профиле экспрессии генов на протяжении этапов дифференцировки свидетельствуют о присутствии в культуре клеток, дифференцированных в гепатоцитарном направлении. Наличие ростовых факторов дифференцировочных сред и выделяемых первичными гепатоцитами оказывало «стабилизирующее» влияние на МСК.

2. Предварительные результаты исследования указывают на положительное влияние трансплантации МСК на обратное развитие фиброза печени у экспериментальных животных.

3. Результаты исследования миграции МСК характеризуют «тропность» МСК к поврежденной печени и селезенке, что может обуславливать положительный эффект клеточной трансплантации.

#### **Задачи дальнейших исследований:**

1. Проследить дальнейшую «судьбу» МСК в печени реципиента после трансплантации.
2. Оптимизировать наиболее эффективный способ трансплантации МСК.
3. Продолжить исследование регенераторных процессов в печени и оценить ее функциональную полноценность.
4. Оценить влияние изменений в печени после клеточной трансплантации на гемодинамику в портальной системе.
5. Разработать механизмы регуляции процессов репопуляции печени стволовыми клетками, а также оценить риски возможных осложнений.
6. Разработать модель биоинженерного аналога печени.

#### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Долгих, М. С. Перспективы терапии печеночной недостаточности с помощью стволовых клеток / М. С. Долгих // Биомедицинская химия. — 2008. — Т. 54, вып.4. — С. 376–391.
2. Готье, С. В. Трансплантация печени: современное состояние проблемы / С. В. Готье // Альманах Института хирургии имени А.В.Вишневского. — 2008. — Т. 3, № 3. — С. 9–17.
3. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone / Н. Zhu [et. al.] // Nat Protoc. — 2010. — № 5(3). — P. 550–560.