

Регенерация патологически измененной печени карпа после межвидовой трансплантации стволовых клеток

Г.И. Пронина¹, А.О. Ревякин¹, Н.Ю. Корягина², Г.Д. Капанадзе¹,
О.И. Степанова¹, Н. В. Петрова¹, Ж.О. Курищенко¹

¹ – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России, Московская область

² – ФГБУН Всероссийский научно-исследовательский институт ирригационного рыбоводства (ФГБУН ВНИИР), Москва

Контактная информация: к.б.н. Ревякин Артем Олегович, scbmt@yandex.ru

Одним из путей восстановления паренхиматозных органов при нарушениях различного генеза является трансплантация стволовых клеток. Целью настоящих исследований явилось изучение регенерации печени молоди карпа с искусственно вызванной патологией под влиянием стволовых клеток мышей-доноров. Жировая дистрофия печени карпа вызывалась 7-кратным оральным введением Парацетамола в дозе 15 г/кг. Эксперимент показал приживаемость стволовых клеток мышей-доноров в печени молоди карпа и успешную регенерацию органа. Это было подтверждено обнаружением гена зеленого белка и проведением полимеразной цепной реакции, а также обнаружением донорских флуоресцирующих клеток в криосрезах печени молоди карпа и гепатопанкреаса речных раков. При этом у гидробионтов происходит интенсивная регенерация тканей и полное восстановление пораженных органов. Результаты исследований позволяют расширить возможности трансплантации стволовых клеток в разработке медико-биологических исследований моделей *in vivo* в области клеточных технологий.

Ключевые слова: стволовые клетки, рыбы, печень, регенерация.

Введение

Регенеративная терапия (восстановление поврежденных органов и тканей) посредством клеточной терапии – один из трендов современной медицинской науки и практики. Тканевой гомеостаз включает поддержание оптимального клеточного состава путем скоординированных во времени процессов гибели части клеток и замещения их новыми. После открытия стволовых клеток (СК) общепринятой стала иерархическая модель регенерации органов и тканей – как для поддержания гомеостаза, так и при восстановлении после повре-

ждений – согласно которой все новые клетки образуются из резидентных или циркулирующих СК через стадию прогениторных, активно размножающихся клеток. Вместе с тем, анализ регенерации печени показывает, что это не всегда так. Восстановление печени может идти за счет СК, но чаще происходит за счет дифференцированных клеток после их дедифференцировки. В последнем случае реализуется стохастическая модель регенерации, при которой образование новых клеток происходит не из специальных, а из любых клеток ткани.

До недавнего времени общепринятым было мнение, что регенерация печеночной паренхимы происходит за счет дифференцированных клеток – в основном, гепатоцитов, при некотором участии других клеточных типов, таких как клетки Купфера, эндотелий и эпителий желчных протоков. Было, в частности, показано, что в норме и в процессе регенерации после повреждения имеет место как размножение клеток, так и их гипертрофия. Некоторые гепатоциты увеличиваются в размерах и в них происходит эндоредупликация геномной ДНК, но без митоза. Выявлено, что при некоторых видах повреждения в регенерации печени участвуют не только дифференцированные клетки, но и резидентные и циркулирующие СК. Механизм восстановления печеночной паренхимы зависит от обстоятельств: норма, частичная гепатэктомия, отравление химическими агентами и т.п. Существенно различаются пути восстановления за счет собственных ресурсов и за счет трансплантированных клеток. Печень способна к выраженной регенерации в ответ на утрату гепатоцитов, имеющую любую природу. Даже если удалено 2/3 печени, масса органа восстанавливается в течение нескольких недель. Регенеративный ответ вполне предсказуем, его можно воспроизвести в эксперименте. У подопытных животных первоначальный ответ, продолжающийся 24 ч, проявляется в гипертрофии гепатоцитов. Затем следует диффузная гиперплазия этих клеток, начинающаяся в перипортальных зонах и достигающая пика примерно через 30 ч. Пролиферативный ответ убывает, когда восстанавливается исходная масса печени. После удаления 15% ткани печени

пролиферируют лишь перипортальные гепатоциты. Вслед за гепатоцитами в митоз вступают и другие эффекторные клетки печени, которые таким образом участвуют в восстановлении массы органа. Имеются доказательства того, что во взрослом организме в печени и в поджелудочной железе присутствуют клетки-предшественники паренхиматозных клеток обоих органов, так называемые печеночно-панкреатические СК [2, 6].

Ранее нами было показано (на крысах, мини-свиньях) моделирование гепатита и коррекция его СК [4]. Исходя из полученных данных, мы решили использовать пойкилотермные организмы, находящиеся на более низкой ступени эволюции – как по этическим соображениям, так и для изучения возможности экстраполяции результатов, полученных на этих альтернативных биомоделях на высших позвоночных.

Целью настоящей работы являлось изучение регенерации печени рыб после введения стволовых клеток мышей-доноров.

Материалы и методы

Объектами эксперимента являлись сеголетки карпа (*Cyprinus carpio L.*) чешуйчатой и зеркальной групп. Патология печени рыб была смоделирована Парацетамолом. Препарат вводился *per os* в дозе 15 г/кг с 1 мл дистиллированной воды 7-кратно в течение 14 дней. В качестве контроля были взяты рыбы, которым препарат не вводился.

Все работы по выделению клеток и их культивированию проводились в соответствии с общими принципами культуральных исследований на живых и трупных донорах (время гибели животных – 30-40 мин). Исследовали жизнеспособность

клеток гемопоэтической и стромальной фракций клеток костного мозга (ККМ) по окраске трипановым синим.

Забор ККМ проводили у мышей-доноров (содержащих ген зеленого белка (GFP)) под эфирным наркозом. Стерильно иссекали кости предплечья, плеча, голени и бедра вместе с суставами и отделяли их от мышц. Далее кости обрабатывали в 70% спирте, стерильно ножницами отсекали суставы и с помощью шприца вымывали ККМ раствором Хенкса (без Ca^{2+} и Mg^{2+}) из костномозгового канала.

Полученную смешанную суспензию клеток центрифугировали вместе с лизирующим раствором (114 mM NH_4Cl ; 7,5 mM KHCO_3 ; 100 мкМ EDTA) из расчета 1:4 в течение 5 мин при 1500 об/мин при комнатной температуре 22°C. Затем надсадочную фазу удаляли путем отсасывания. Отмытую от эритроцитов и полученную смесь клеток ресуспендировали в питательной ростовой среде DMEM (ПанЭко), содержащей 25мМ NEPER, 0,58 г/л глутамина, 100мкг/л гентамицина, 10% бычьей эмбриональной сыворотки (HyClone, USA), 5 мкг/л инсулина. Клетки культивировали во флаконах при +37°C в CO_2 -инкубаторе, атмосфере с 5% CO_2 и 95% влажности в течение 3-х суток [1].

Через 3 суток культура ККМ мышей содержала до 50% свободно плавающих в суспензии с питательной средой округлых неприкрепившихся гемопоэтических клеток на разных сроках дифференцировки (гемопоэтические клетки, лимфоциты, моноциты) и до 50% прикрепившихся к пластику распластаных фибробластоподобных клеток – мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК КМ). Полученная

смешанная культура из гемопоэтических и стромальных ККМ от мышей-доноров была готова для трансплантации (рис. 1).

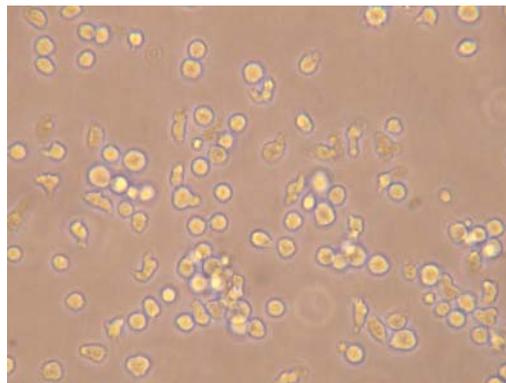


Рис. 1. Культура клеток на третьи сутки культивирования.

Культура ККМ вводилась рыбам внутривенно в хвостовую вену. Доза введения составила 8-10 млн культивированных ККМ.

Гибели рыб на всем протяжении эксперимента не отмечалось. Вскрытие опытных объектов производилось на 7, 14 и 21 день после введения ККМ.

Внутренние органы фиксировались в 10% растворе формалина. Затем, после обезвоживания и заливки в парафин, готовились гистологические срезы при помощи микротомы с последующим окрашиванием гематоксилин-эозином. Гистологические исследования проводились с помощью цифровой микроскопии.

Результаты и их обсуждение

Под действием Парацетамола в печени рыб отмечены дистрофические изменения гепатоцитов – сочетание белковой и жировой дистрофии. Количество ядер гепатоцитов существенно меньше по сравнению с нормой.

Эксперимент показал успешную трансплантацию стволовых клеток мышей рыбам. Отмечалось зеленое свечение ККМ с геном GFP при микроскопии печени. Эти результаты подтверждены проведением полимеразной цепной реакции (ПЦР): в опытных образцах был идентифицирован ген GFP.

Через 2 недели после введения стволовых клеток происходит снижение количества патологически измененных гепатоцитов, местами просматривается их регенерация, незначительные или умеренно выраженные воспалительные изменения в строме органа (рис. 2, 3).

Заключение

Таким образом, показано, что клетки костного мозга мышей успешно приживаются в организме рыб. Патологически измененная печень рыб после моделирования патологии Парацетамолом успешно регенерирует через 2-3 недели после введения стволовых клеток, что подтверждается гистологическими исследованиями.

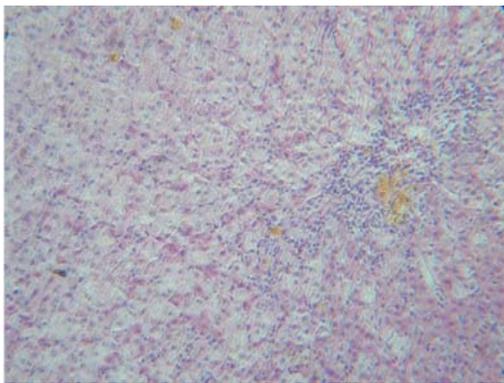


Рис. 2. Регенерация патологически измененной печени карпа. Инфильтрация портального тракта и незначительная инфильтрация клетками белой крови паренхимы. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. x200.

Список литературы

1. *Касинская Н.В., Степанова О.И., Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Семенов Х.Х., Бескова Т.Б., Капанадзе Г.Д., Ревякин А.О., Денъгина С.Е.* Ген зеленого белка как маркер при трансплантации стволовых и прогениторных клеток костного мозга // Биомедицина. 2011. № 2. С. 30-34.
2. *Маслюков А.К., Сугачевская Е.В.* Стволовые клетки и их применение в практической медицине // www.transplantology.com. 2004.
3. *Ревякин А.О., Казакова Л.Х., Капанадзе Г.Д.* Мини-свинья как биомодель токсического гепатита // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. 2011. № 5.
4. *Ревякин А.О., Капанадзе Г.Д., Казакова Л.Х., Степанова О.И., Касинская Н.В., Кольшиев И.Ю.* Моделирование стойкого токсического гепатита на мини-свиньях светлогорской популяции // Биомедицина. 2012. № 4. С. 92-95.
5. *Ярыгин К.Н.* Роль резидентных и циркулирующих стволовых клеток в физиологической и репаративной регенерации // Патологическая физиология и экспериментальная терапия: кварталный научно-теоретический журнал / Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова. - М.: Медицина. 2008. № 1. С. 2-8.
6. *Michalopoulos G.K.* Liver regeneration after partial hepatectomy. critical analysis of mechanistic dilemmas // The American Journal of Pathology. 2010. Vol. 176. № 1. P. 2-13.

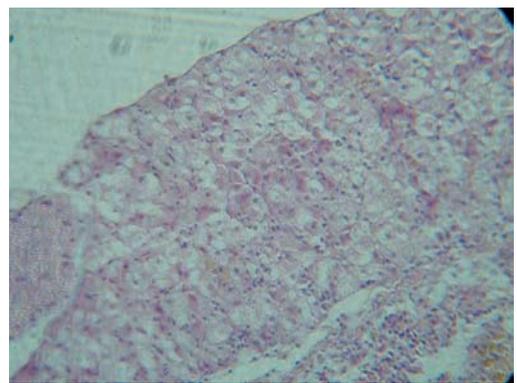


Рис. 3. Регенерация гепатоцитов после введения стволовых клеток. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. x400.

Regeneration of pathologically changed liver of the carp after interspecific transplantation of stem cells

G.I. Pronina, A.O. Revyakin, N.Yu. Koryagina, G.D. Kapanadze,
O.I. Stepanova, N. V. Petrova, Zh.O. Kurischenko

One of ways of restoration of parenchymatous bodies at violations of various genesis is transplantation stem cells. The purpose of the real researches was studying of regeneration of a liver thresh a carp with artificially caused pathology under the influence of stem cells of donor mice. Fatty dystrophy of a liver of a carp was caused by 7-fold introduction of per os paracetamol in a dose of 15 g/kg. Experiment showed survival of stem cells of mice of donors in a liver threshes a carp and successful regeneration of body. It was confirmed with detection of a gene of green protein and the polymerase chain reaction (PCR), and also detection of the donor fluorescing cages in cryocuts of a liver thresh a carp and a hepatopancreas of crawfishes. Thus hydrobionts have an intensive regeneration of fabrics and a complete recovery of the struck bodies. Results of researches will allow expanding possibilities of transplantation of stem cells in development of medicobiological researches of in the vivo models in the field of cellular technologies.

Key words: stem cells, fishes, liver, regeneration.