



ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВВЕДЕНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ ОСТРОМ И ХРОНИЧЕСКОМ ПАНКРЕАТИТЕ У КРЫС

Лазебник Л.Б., Трубицына И.Е., Агафонов М.А., Князев О.В., Люндуп А.В

ГУ Центральный научно-исследовательский институт гастроэнтерологии ДЗ г. Москвы

Трубицына Ирина Евгеньевна

Тел.: +7 (495) 304 3096

E-mail: ie.trubitsyna@gmail.com

РЕЗЮМЕ

Прежде чем использовать трансплантацию МСК в клинике, необходимо провести доклинические исследования введения МСК животным при остром и хроническом панкреатите. Отработать сроки и дозу введения МСК. Обосновать целесообразность трансплантации МСК для обеспечения регенерации поврежденной ткани поджелудочной железы. Сущность проводимого эксперимента заключается в том, чтобы установить наличие общих патогенетических механизмов развития процессов патологии и саногенеза токсического повреждения ткани поджелудочной железы.

Целью исследования было отработать на крысах модель острого и хронического панкреатита, изучить благоприятное и отрицательное действие аллогенных стволовых клеток на регенераторно-восстановительные процессы.

Для клеточной трансплантации использовали стромальную фракцию клеток аллогенного костного мозга (КМ), суспензию клеток вводили в дозе 2×10^6 и 5×10^6 клеток.

Ключевые слова: трансплантация мезенхимальных стромальных клеток; острый; хронический панкреатит; экспериментальное моделирование.

SUMMARY

Before using MSC transplantation in the clinic to conduct preclinical studies MSCs to animals with acute and chronic pancreatitis. Work out the timing and dose of MSCs. The rationale of MSCs transplantation for the regeneration of damaged pancreatic tissue. The essence of the experiments is to establish the existence of common pathogenetic mechanisms for the development of pathological processes and sanogenesis toxic damage of pancreatic tissue.

The study was work out in the rat model of acute and chronic pancreatitis, to explore beneficial and adverse effects of allogeneic stem cells for regenerative-reduction processes.

For cell transplantation using allogenic stromal cell fraction of bone marrow, the cell suspension was injected at a dose of $2 \cdot 10^6$ and $5 \cdot 10^6$ cells.

Keywords: transplantation of mesenchymal stromal cells; acute; chronic pancreatitis; an experimental simulation.

Трансплантация мезенхимальных стромальных клеток костного мозга (МСК) — новое перспективное направление в лечении больных хроническими прогрессирующими заболеваниями органов пищеварения. Формирование этих заболеваний проходит на фоне дисбаланса соотношений между про- и противовоспалительными цитокинами [1]. Все это дало возможность предположить,

что, используя регенерационные возможности стволовых клеток, можно регулировать местные и системные нарушения репарации. Доказано, что в патогенезе хронического панкреатита как в период деструктивных изменений, так и при регенерации поврежденной ткани иммунопатологические (аутоиммунные) механизмы играют ведущую роль [2; 3].

В ранее проведенных работах установлено, что МСК могут восстановить нарушенный цитокиновый статус [5–8]. Эффективность стромальной фракции клеток костного мозга (КМ) обусловлена не только тем, что эти клетки секретируют широкий спектр цитокинов и ростстимулирующих факторов, но и тем, что, являясь предшественниками мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), способны активно пролиферировать, дифференцироваться в мезенхимальные клетки других фенотипов и непосредственно участвовать в процессах восстановительной регенерации поврежденных тканей. Кроме того, ММСК КМ могут участвовать в регуляции дифференцировки Т-клеток, вызывают супрессию пролиферации эффекторных клеток (цитотоксических Т-лимфоцитов, натуральных киллеров), а также, ограничивая дифференцировку дендритных клеток, способны ингибировать системную воспалительную реакцию [9]. Благодаря регуляторным эффектам пептидов, продуцируемых клетками КМ, оказалось оправданным их применение при лечении многих хронических заболеваний, сопровождающихся угнетением репаративных процессов, иммунной дисрегуляцией и развитием вторичного иммунодефицита [10]. Использование прекультивированных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток аутологичного костного мозга способствует заживлению длительно незаживающих аутоиммунных язв желудка [2; 3].

С учетом вышеизложенного необходимо провести доклинические исследования введения МСК животным при остром и хроническом панкреатите [11], прежде чем использовать трансплантацию МСК в клинике. Отработать сроки и дозу введения МСК. Обосновать целесообразность трансплантации МСК для обеспечения регенерации повреждений ткани поджелудочной железы. Сущность проводимого эксперимента заключается в том, что требуется установить наличие общих патогенетических механизмов развития процессов пато- и саногенеза токсического повреждения ткани поджелудочной железы как в клинике, так и в условиях эксперимента.

Цель исследования — отработать на крысах модель острого и хронического панкреатита, изучить благоприятное и отрицательное действие аллогенных стволовых клеток на регенераторно-восстановительные процессы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для клеточной трансплантации использовали стромальную фракцию клеток аллогенного костного мозга (КМ), которые содержат стволовые и прогениторные клетки.

Опыты проведены на белых крысах весом 190–210 г. Все эксперименты проводились в соответствии с правилами гуманного обращения с животными, манипуляции выполняли под общей анестезией с соблюдением требований асептики и антисептики.

Повреждение ткани поджелудочной железы вызывали 100%-ной уксусной кислотой в объеме 0,01 мл, нанося ее на поверхность поджелудочной железы. Животные были разделены на три группы по 5 животных в каждой группе: контрольная и две опытные, всего 25 крыс. Контрольная группа — воспроизведение панкреатита и в/брюшинное введение 2,0 мл физиологического раствора.

Мононуклеарные клетки получали из аспирата КМ животных. Для этого под эфирным наркозом из костномозгового канала большеберцовых костей получали клетки КМ путем промывания полости этих костей фосфатно-буферным раствором, содержащим 50 ЕД/мл гепарина и 0,25 мг/л гентамицина. Эти клетки представляли собой первичную культуру, преимущественно мононуклеарных клеток КМ, которые затем высаживали в количестве 2,0–2,5 млн кл/мл на чашки Петри при 37 °С в инкубаторе. На 12–14-е сутки культивирования ММСК формировался 95–100%-ный монослой клеток с фибробластоподобной морфологией, которые использовали для трансплантации животным.

Опытные животные — 1-я группа, воспроизведение панкреатита, трансплантация МСК 2,0 мл суспензии. В 1-й группе животным проводилась внутрибрюшинная трансплантация суспензии МСК при остром (5 животных) и хроническом (5 животных) панкреатите в дозе 2×10^6 клеток дважды — на 2-й и 8-й день после воспроизведения острого панкреатита.

Во 2-й группе проводилась внутрибрюшинная трансплантация суспензии МСК в дозе 5×10^6 клеток однократно (на 2-й день после воспроизведения острого панкреатита, 10 крыс). Животных выводили из эксперимента на 10-е и 30-е сутки после воспроизведения острого панкреатита.

Острый панкреатит. 10-е сутки после воспроизведения острого панкреатита — контроль (без трансплантации): поджелудочная железа отечна, спаяна с окружающими органами желудком, двенадцатиперстной кишкой, образуя конгломерат, выделение травматично или невозможно (рис. 1 см. на цветной вклейке). Видны множественные межкишечные и подпеченочные абсцессы, некроз ткани поджелудочной железы, гиперемия окружающих тканей.

Опыт (трансплантация МСК) — в дозе 2×10^6 клеток в 2,0 мл физиологического раствора. Поджелудочная железа отечна. Межкишечные абсцессы отсутствуют. Ткань поджелудочной железы спаяна с окружающими тканями, но легко отделяется без травмирования и кровотечений. Поджелудочная железа легко выделяется, единичные, небольшие некрозы, без слияния (рис. 2 А, Б см. на цветной вклейке).

Трансплантация суспензии МСК в дозе 5×10^6 клеток — острый панкреатит, поджелудочная железа



запаяна полностью, выделение ее невозможно (рис. 3 см. на цветной вклейке). Кишечник раздут, частичная кишечная непроходимость, серозная оболочка гиперемирована, венозный стаз (рис. 4 А см. на цветной вклейке).

Хронический панкреатит. Аутопсия животных на 30-е сутки после воспроизведения панкреатита. Ревизия органов брюшной полости: в группе животных без введения препарата остаются мелкие межкишечные абсцессы. Гиперемия органов брюшной полости. Поджелудочная железа спаяна с окружающими органами (желудок, печень, сальник), поджелудочную железу можно выделить. При выделении травмируется ткань поджелудочной железы и серозной оболочки тонкой кишки. Масса ткани поджелудочной железы уменьшена (рис. 4 Б см. на цветной вклейке).

После трансплантации в дозе $2 \cdot 10^6$ клеток. Очагов некроза нет, петли кишечника лежат свободно. Поджелудочную железу легко выделить, масса ткани поджелудочной железы без изменений. Гиперемия органов брюшной полости, кровотоочивости при дотрагивании нет. Микроскопия: выраженный отек, лейкоцитарная инфильтрация. Дольчатость органа нарушена за счет обширного лейкоцитарного инфильтрата.

Группа животных после введения МСК в дозе $5 \cdot 10^6$ клеток. На 30-е сутки при внешнем осмотре поджелудочная железа не образует плотного конгломерата с окружающими тканями, ее можно с трудом выделить, имеются единичные межкишечные абсцессы.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Воспроизведение экспериментального панкреатита сопровождается деструктивными изменениями, которые имеют особенность, характерную только для ткани поджелудочной железы, которая синтезирует и секретирует ферменты, обладающие высокой протео- и липолитической активностью. Поэтому внутритканевая или протоковая активация этих ферментов приводит к «расплавлению» окружающих тканей и усугублению повреждения. Уменьшение некротических процессов может предотвратить

образование обширных повреждений ткани поджелудочной железы. Установлена прямая связь цитокинового дисбаланса с активностью деструктивного процесса при остром и хроническом панкреатите, что предполагает использование направленных воздействий на реакции иммунного ответа с целью регуляции дисбаланса в системе Th1/Th2 [6–8; 10].

Поэтому применение препаратов, обладающих противовоспалительным и иммуномодулирующим эффектами, является патогенетически обоснованной терапией острого и хронического панкреатита. Они препятствует переходу отеочной формы панкреатита в деструктивную.

Несомненно, экспериментальное воспроизведение острого и хронического панкреатита имеет общие черты с практикой, но к ней совсем не сводится, так как является методом познания для изучения патогенеза изучаемой патологии, но в то же время является методом, используемым в доказательной медицине. В эксперименте установлено, что у крыс с острым и хроническим панкреатитом присутствует аутоиммунный компонент, обусловленный обширными некротическими повреждениями ткани поджелудочной железы [2; 3], что, несомненно, вызывает цитокиновый дисбаланс и нарушение иммунной регуляции восстановительных процессов [9]. По данным ранее проведенных исследований показано, что МСК костного мозга устраняют местный и системный дисбаланс про- и противовоспалительных цитокинов [1–3; 6].

Анализируя полученные данные, можно сделать выводы, что трансплантация аллогенных МСК снижает воспалительную реакцию и ускоряет процессы регенерации поврежденной ткани поджелудочной железы, происходит сокращение сроков и выраженности деструктивно-воспалительной фазы, активизация пролиферативно-регенераторных процессов. Многократная трансплантация МСК в меньшей дозе ($2 \cdot 10^6$ клеток) оказывает более благоприятное действие, чем однократная трансплантация в большой дозе ($5 \cdot 10^6$ клеток). Трансплантация МСК в дозе $2 \cdot 10^6$ клеток может быть использована как при остром, так и хроническом повреждении ткани поджелудочной железы. При остром панкреатите нельзя рекомендовать трансплантацию МСК в дозе $5 \cdot 10^6$ клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аскарлов М.Б., Трубицына И.Е., Хохлова М.К., Онищенко Н.А. Протиовоспалительные цитокины у крыс с экспериментальной язвой желудка с иммунопатологическим компонентом // Эксперим. и клин. гастроэнтерол. — 2009. — № 2, Прил. № 1. — С. 9–11.
2. Аскарлов М.Б., Трубицына И.Е., Онищенко Н.А. К механизму ускоренной регенерации длительно незаживающих язв желудка при трансплантации фибробластоподобных стромальных клеток аутологичного костного мозга // Эксперим. и клин. гастроэнтерол. — 2009. — № 2, Прил. № 1. — С. 6–7.
3. Аскарлов М.Б., Воробьева Н.Н., Трубицына И.Е., Онищенко Н.А. Коррекция цитокинового дисбаланса и стимуляция регенерации длительно незаживающих аутоиммунных язв желудка при перилульцерозной трансплантации мононуклеарных клеток аутологичного костного мозга // Эксперим. и клин. гастроэнтерол. — 2009. — № 4. — С. 52–55.
4. Trubitsyna I.E., Vinokurova L.V., Chikunova B.Z., Lazebnik L.B. Tolerance of gastroduodenal zone organs on acute and chronic pancreatitis in rats / 42nd European Pancreatic Club, June 16–19, 2010, Stockholm // Pancreatology. — 2010. — Vol. 10. — P. 331.
5. Lazebnik L.B., Vinokurova L.V., Trubitsyna I.E. Autoimmune component on chronic pancreatitis / 42nd European Pancreatic Club, June 16–19, 2010, Stockholm // Pancreatology 2010. — Vol. 10. — P. 292.
6. Lazebnik L.B., Onishchenko N.A., Lyundup A.V. et al. Regeneration of toxic damaged liver in rats after introduction of mesenchymal stromal marrow cells // Book of Abstracts, 6th Central European Gastroenterology Meeting, 24–26 June 2010, Prague.
7. Lazebnik L., Trubitsyna I., Knyazev O., Churikova A. Effect of systemic transplantation of allogenic mesenchymal stromal cells of bone marrow on tissue's cytokines in the mucosa in Ulcerative Colitis / 18th United

European Gastroenterology Week, 23–27 October 2010, Barcelona, Spain // Gut. — 2010. — Vol. 59, Suppl. III. — A301.

8. Агафонов М.В., Трубицына И.Е., Винокурова Л.В., Чикунова Б.З. Возможности экспериментального воспроизведения хронического и острого панкреатита / Сб. тезисов конф. «Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины». — СПб., 2010. — С. 61–62.

9. Aggarwal S., Gollapudi S., Gupta S. Increased TNF-alpha-induced apoptosis in lymphocytes from aged humans: Changes in TNF-alpha

receptor expression and activation of caspases // J. Immunol. — 1999. — Vol. 162, № 4. — P. 2154–2161.

10. Аскарлов М.Б., Онищенко Н.А. Влияние мононуклеарной фракции клеток аутологичного костного мозга на морфофункциональное состояние тимуса и селезенки, иммунный (цитокиновый) статус и регенерацию длительно незаживающих аутоиммунных язв желудка у крыс // Вестн. трансплантол. и искусств. органов. 2009.— № 1. — С. 36–40.



ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВВЕДЕНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ ОСТРОМ И ХРОНИЧЕСКОМ ПАНКРЕАТИТЕ У КРЫС



Рис. 1. Подпеченочный абсцесс — контрольные животные, введение физиологического раствора. Ув. $\times 3$



Рис. 2. Петли тонкой и толстой кишки переплетены (А); выделение поджелудочной железы, отек, сосудистый рисунок усилен, венозный застой, трансплантация МСК в дозе $2 \cdot 10^6$ клеток. Ув. $\times 2$

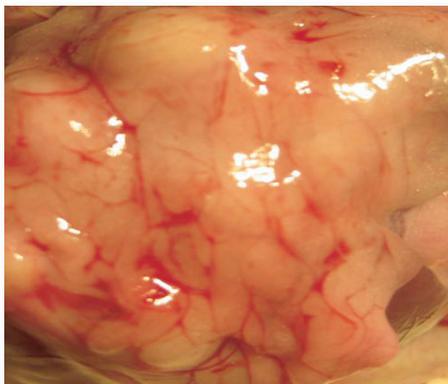


Рис. 3. Поджелудочная железа запаяна, видны множественные абсцессы, выделение поджелудочной железы невозможно, трансплантация МСК в дозе $5 \cdot 10^6$ клеток. Ув. $\times 2$

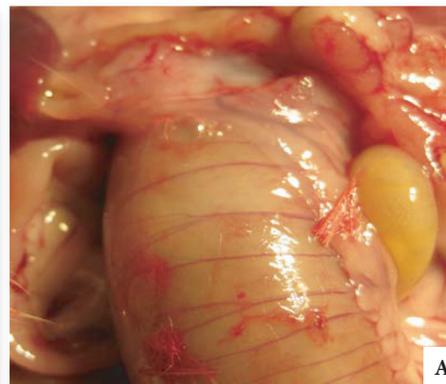


Рис. 4. А — острый панкреатит после введения $5 \cdot 10^6$ клеток, толстый кишечник раздут, частичная кишечная непроходимость, ув. $\times 2$; Б — хронический панкреатит, ткань отечна, гиперемирована, поджелудочная железа уменьшена, трансплантация МСК в дозе $5 \cdot 10^6$ клеток, ув. $\times 3$

