

**Ю.А. Кожевников, И. В. Савкин, Д.М. Самарин, Г.В. Селедцова,
В.И. Селедцов, Н.Г. Колосов**

ЭФФЕКТИВНОСТЬ КЛЕТОЧНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ПЕЧЕНОЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск
ГОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет Росздрава

Экспериментально показано, что трансплантация сингенных клеток костного мозга (ККМ), так же, как и аллогенных клеток фетальной печени (КФП), способствует функциональному печеночному восстановлению как при острой печеночной недостаточности (ОПН), так и при циррозе печени (ЦП). Согласно биохимическим и патоморфологическим данным, внутрипеченочный путь трансплантации клеток наиболее эффективен при ОПН, при ЦП — внутрипеченочный. Внутрипортальное введение клеток оказалось малоэффективным как при ОПН, так и при ЦП. Полученные данные могут стать экспериментальной основой для внедрения клеточных технологий в практику лечения тяжелых заболеваний печени.

Ключевые слова: стволовые клетки, цирроз печени, острая печеночная недостаточность

Острая печеночная недостаточность (ОПН) и цирроз печени (ЦП) — тяжелые заболевания с неблагоприятным прогнозом течения. Стандартное лечение этих заболеваний во многих случаях является малоэффективным. Поэтому летальность при возникновении тяжелых форм печеночной недостаточности достигает 70-90% [1, 2]. Одна из причин низкой эффективности лечения тяжелых заболеваний печени заключается в отсутствии препаратов, способных стимулировать полноценное восстановление печеночной ткани. Одним из действенных методов стимуляции регенерации печени является трансплантация низкодифференцированных (стволовых) клеток [3-5]. В силу своей технической доступности клеточная трансплантация может стать преимущественной альтернативой органной трансплантации. Тем не менее невыясненными остаются тип стволовых клеток и их способность длительно выживать в условиях несовместимого по антигенам гистосовместимости микроокружения в процессе функционального восстановления поврежденной печени. Не установлены пути введения клеток, оптимальные для лечения печеночной недостаточности. Нерешенные вопросы теоретического и прикладного характера предопределили содержание настоящего исследования.

Методика

Исследование выполнено на линейных мышах C57Bl/6 и BALB/c с массой тела 20-22 г. Возраст животных был не моложе 3 месяцев. В общей сложности в экспериментах было использовано

221 животное. Эксперименты на животных проводились в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977г. №755).

ОПН развивалась на 5-е сутки после однократного внутрибрюшинного введения 40 мкл масляного раствора четыреххлористого углерода. ЦП развивался на 60-е сутки после начала введения масляного раствора четыреххлористого углерода, который инъецировался в дозе 30 мкл 1 раз в неделю. Развитие ОПН и ЦП подтверждалось биохимическими и морфологическими критериями.

Клеточный трансплантат содержал либо 5×10^7 сингенных (C57BL/6) клеток костного мозга (ККМ), полученных от взрослых животных, либо 5×10^7 аллогенных (BALB/c) клеток фетальной печени (КФП). Клетки трансплантировали под эфирным наркозом внутривенно (в орбитальный синус), внутрипеченочно (в 3 точки) или внутрипортально (в воротную вену).

Каждая экспериментальная группа состояла из 10 мышей, тогда как контрольная группа включала в себя 15 животных. Контрольным мышам вводили по 0,3 мл среды RPMI-1640 (Sigma, USA). Забор крови для оценки биохимических показателей проводили через 6 недель после клеточной трансплантации. Биохимические показатели (АЛТ, АСТ, тимоловая проба, лактатдегидрогеназа, общий белок, альбумин, общий холестерин) определяли с использованием рутинных лабораторных методов.

Для анализа морфологических изменений печеночной ткани выполняли аутопсию печени, а также учитывали ее весовые показатели. Окраску гистологических препаратов проводили гематоксилин-эозином и по Ван-Гизону. Выраженность патоморфологических изменений в печени определяли с помощью индекса гистологической активности (ИГА), известного как «индекс Knodell».

Статистическую значимость различий определяли после проверки нормальности распределения данных тестами Колмогорова — Смирнова. Все измеряемые параметры распределялись в соответствии с нормальным законом распределения, поэтому для оценки достоверности различий использовали t-критерий Стьюдента. Представленные данные отражают результаты не менее 2 однотипных экспериментов.

Результаты и обсуждение

Значимым критерием эффективности методов коррекции ОПН является снижение летальности. Наибольшая летальность была выявлена в контрольной группе, где она составила 40%. Летальность в группе с внутрипортальным введением КФП составила 30%, в группах с внутрипортальным и внутривенным введением ККМ — 20%, а в группах с внутривенным введением клеток — 10%.

Исходно, в результате развития ОПН все 8 исследованных параметров (АЛТ, АСТ, тимоловая проба, лактатдегидрогеназа, общий белок, альбумин, общий холестерин, вес печени) были за пределами нормы. Эти сдвиги были устойчивыми и сохранялись у контрольных животных с ОПН в течение всего периода наблюдения (6 недель). В то же время статистически значимые изменения в сторону нормализации исследуемых параметров были отмечены у экспериментальных животных, получавших лечение в виде трансплантации стволовых клеток различного происхождения (Рис. 1). Исходя из количества статистически значимо скорректированных параметров, наиболее выраженный эффект клеточной трансплантации



Рис. 1. Эффективность клеточной трансплантации при острой печеночной недостаточности

имел место при внутривенном введении ККМ (8 параметров) и при внутривенном введении КФП (7 параметров). Наименее эффективным оказался внутрипортальный путь введения клеток. Промежуточное положение заняла внутрипеченочная трансплантация ККМ (3 параметра). Более значимым при этом пути введения оказалось влияние трансплантированных в печень КФП, которое затронуло 6 параметров.

Как следует из таблицы 1, наименьший уровень ИГА был отмечен при внутривенном и при внутрипеченочном введении КФП. Близкий к этому результат был достигнут при внутривенном введении ККМ.

Таким образом, в модели ОПН наиболее эффективное функциональное и морфологическое восстановление печени было достигнуто при внутривенном введении сингенных ККМ или аллогенных КФП.

Исходно в результате развития ЦП все 8 исследованных параметров (АЛТ, АСТ, тимоловая проба, лактатдегидрогеназа, общий белок, альбумин, общий холестерин, вес печени) претерпели статистически значимые патологические изменения. В контрольной группе эти изменения сохранялись на протяжении всего периода наблюдения (6 недель) (Рис. 2). Как и в случае с ОПН, трансплантированные клетки обладали способностью существенно

Таблица 1

Патоморфологические изменения печени при острой печеночной недостаточности

Патоморфологические изменения печени при острой печеночной недостаточности								
Патоморфологические изменения	Введение клеток						Исходное значение	Контрольное значение
	Внутривенное		Внутрипортальное		Внутрипеченочное			
	ККМ	КФП	ККМ	КФП	ККМ	КФП		
Перипортальные некрозы (включая мостовидные)	5	5	8	8	6	5	10	9
Внутридольковые некрозы, дистрофия гепатоцитов	2	1	3	3	2	2	4	4
Воспалительный инфильтрат	2	2	2	2	3	2	4	2
Индекс гистологической активности (ИГА)	9	8	13	13	11	9	18	15

Примечание. ККМ — клетки костного мозга, КФП — клетки фетальной печеночной ткани

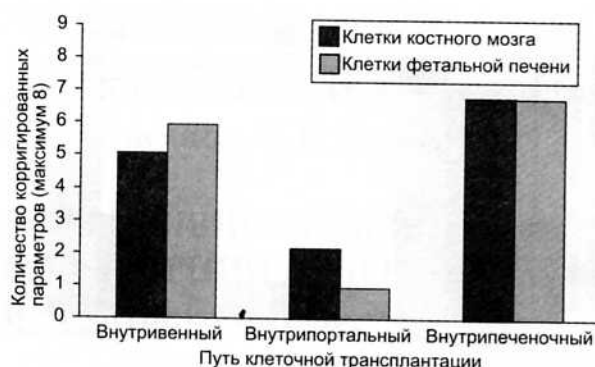


Рис. 2. Эффективность клеточной трансплантации при циррозе печени

корректировать измененные в результате развития болезни биохимические параметры крови. Исходя из количества параметров, подвергшихся статистически значимой коррекции, наиболее выраженный эффект клеточной трансплантации был достигнут при внутрипеченочном введении ККМ (7 параметров) или КФП (7 параметров). Несколько меньшее влияние было отмечено при внутривенном введении ККМ (5 параметров) или КФП (6 параметров). Так же, как и при ОПН, наименее эффективным оказался внутрипортальный путь введения клеток. Результаты биохимических исследований соответствовали данным гистологических исследований. Наиболее низкий уровень ИГА был отмечен при внутрипеченочном введении клеток (Таблица 2).

В целом, результаты нашего исследования согласуются с опубликованными экспериментальными данными [6, 7, 9, 10], свидетельствующими о способности низкодифференцированных (стволовых) клеток активно включаться в процессы репарации печеночной ткани. Подтверждением этому также являются наши собственные клинические наблюдения эффективного применения трансплантации КФП в лечении цирроза печени [4].

В свете представленных данных можно заключить, что внутривенная трансплантация стволо-

вых клеток — это наиболее подходящий способ лечения ОПН, тогда как внутрипеченочную трансплантацию наиболее предпочтительно использовать при ЦП. Интересно, что не только КФП, но и ККМ были эффективно задействованы в процессе функционального восстановления поврежденной печени. Воздействие ККМ на восстановление функций печени может быть связано не только с реализацией их собственного пролиферативного и дифференцировочного потенциала, но также с их стимулирующим влиянием на функциональную активность зрелых гепатоцитов. Ранее такое системное влияние было экспериментально продемонстрировано и показано, что оно может опосредоваться интерлейкином-6 [6].

Важное значение в лечебном действии трансплантированных низкодифференцированных клеток может иметь их способность реверсировать развитие соединительной ткани. Ранее такая способность была продемонстрирована экспериментально [7, 10] и подтверждена клиническими наблюдениями [9]. Антисклеротический эффект трансплантированных клеток может являться важным условием для формирования ниш, необходимых для роста функционально полноценной печеночной ткани.

Остается не совсем ясным — почему внутрипортальный путь введения стволовых клеток малоэффективен в купировании функциональных печеночных расстройств. Возможно, при попадании в порталный кровоток большинство трансплантированных клеток не находят благоприятных для реализации своего пролиферативного и дифференцировочного потенциала ниш.

В заключение следует заметить, что результаты представленной работы поддерживают точку зрения о перспективности использования клеточных технологий в медицинской практике. Эти результаты могут стать экспериментальной основой для оптимизации новых трансплантационных подходов в лечении тяжелых печеночных расстройств.

Патоморфологические изменения печени при циррозе печени

Таблица 2

Патоморфологические изменения	Введение клеток						Исходное значение	Контрольное значение
	Внутривенное		Внутрипортальное		Внутрипеченочное			
	ККМ	КФП	ККМ	КФП	ККМ	КФП		
Перипортальные некрозы (включая мостовидные)	7	7	8	8	6	5	8	10
Внутридольковые некрозы, дистрофия гепатоцитов.	2	2	4	4	2	1	4	4
Воспалительный инфильтрат	2	2	3	3	2	2	4	4
Фиброз	2	2	3	3	2	2	4	4
Индекс гистологической активности (ИГА)	13	13	18	18	12	10	20	22

Примечание. ККМ — клетки костного мозга, КФП — клетки фетальной печеночной ткани

EFFICIENCY OF CELL TRANSPLANTATION IN TREATING LIVER FAILURE IN EXPERIMENT

Yu. A. Kozhevnikov, I.V. Savkin, D.M. Samarin,
G.V. Seledcova, V.I. Seledcov, N.G. Kolosov

In murine model of both acute liver failure (ALF) and cirrotic liver (CL), it was demonstrated that the transplantation of syngeneic bone marrow cells, as well as allogeneic fetal liver cells may markedly promote functional liver restoration. According biochemical and pathomorphological data, the intravenous pathway of cell grafting was most efficient in treating ALP, whereas the intrahepatic one was most effective in treating CL. The intraportal cell transplantation was found to be least effective in treating the liver disorders. These results can be used as an experimental basis for clinical application of cell-based technologies in treating severe hepatic disorders.

Литература

1. Блюгер А.Ф. Практическая гепатология. / А.Ф. Блюгер, И.Н. Новицкий. — Рига, 1984. — С. 452.
2. Дифференциальная диагностика и лечение внутренних болезней: Руководство для врачей. Т. 2. Болезни органов пищеварения / Под ред. А.И. Хазанова. — М., 2003. — С. 281-306.
3. Козлов В.А. Стволовые клетки: действительность, проблемы, перспективы / В.А. Козлов, В.А. Труфакин, Р.С. Карпов // Вестник РАМН. — 2004. — №9. — С. 32-40.

4. Лечение больных циррозами печени путем трансплантации стволовых клеток / Н.Г. Колосов, А.Я. Величко, О.В. Повещенко, Л.Р. Сиянова // Вопросы реконструктивной и пластической хирургии: Тез. докл. научно-практической конференции. — Томск, 2004. — С. 52-53.

5. Курбатова Г.Р. Трансплантация фетальных тканей при лечении хронического гепатита и цирроза печени / Г.Р. Курбатова // Вестник новых медицинских технологий. — 2002. — Т. 9. — № 4. — С. 39-41.

6. Availability of bone marrow stromal cells in three-dimensional coculture with hepatocytes and transplantation into liver-damaged mice / M. Takeda, M. Yamamoto, K. Isoda // J. Biosci. Bioeng. — 2005. — Vol. 100. — №1. — P. 77-81.

7. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against experimental liver fibrosis in rats / D.C. Zhao, J.X. Lei, R. Chen et al. // World J. Gastroenterol. — 2005. — Vol. 11. — №22. — P. 3431-3440.

8. Cryopreserved fetal liver cell transplants support the chronic failing liver in rats with CCl₄-induced cirrhosis / O.V. Ochenashko, N.A. Volkova, S.P. Mazur, et al. // Cell Transplant. — 2006. — Vol. 15. — №1. — P. 23-33.

9. Mureto, P. Reversibility of cirrhosis in patients cured of thalassemia by bone marrow transplantation / P. Mureto, E. Angelucci, G. Lucarelli // Ann. Intern. Med. — 2002. — Vol. 136. — №9. — P. 667-672.

10. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl₄-induced liver fibrosis in mice / I. Sakaida, S. Terai, N. Yamamoto et al. // Hepatology. — 2004. — Vol. 40. — №6. — P. 1304-1311.