

Стволовые клетки печени

А.Ю. ПЕТРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Стволовые клетки привлекают пристальное внимание клеточных биологов, поскольку их терапевтический эффект открывает неограниченные перспективы лечения ряда генетических и приобретенных заболеваний. Плоды являются самым богатым источником региональных стволовых клеток, которые способны к самообновлению и образованию нескольких типов дифференцированных потомков.

Особый интерес для клеточных биологов, занимающихся стволовыми клетками, представляет печень. Из рисунка видно, что в печени взрослого организма на роль стволовых клеток претендует 2 типа клеток: 1 – гепатоциты в экстремальных условиях (частичная гепатэктомия) они приобретают свойства унипотентных стволовых клеток, которые способны образовывать лишь один тип дифференцированных потомков; 2 – овалы клетки. В отличие от гепатоцитов они слабо дифференцированы и обладают бипотентными свойствами – способны образовывать как гепатоциты, так и холангиоциты.

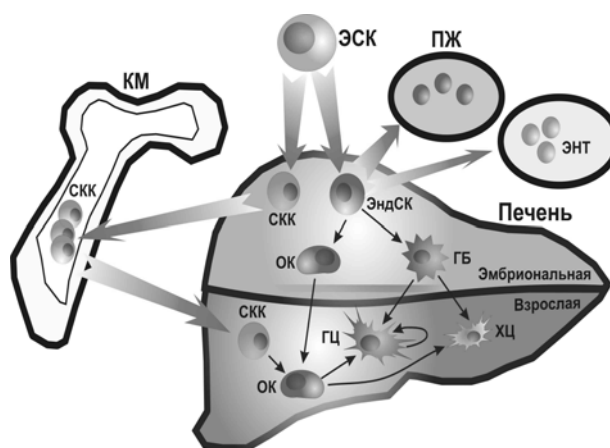
В то же время в эмбриональном развитии, особенно в первом триместре, в печени представлено несколько типов региональных стволовых клеток и клеток-предшественников. Это гепатобласты и овалы клетки, несущие маркеры двух типов – альбумин и цитокератин 19, т.е. являются предшественниками гепатоцитов и билиарных клеток. Кроме того, в эмбриональной печени найдены претенденты на эндодермальные стволовые клетки, которые образовывали колонии в культуре и поэтому были названы (“hepatic colony-forming unit in culture”, H-CFU-C). Они были способны к самообновлению и в течение первых 14 дней культивирования экспрессировали инсулин, глюкагон и соматостатин, являющиеся маркерами β -, α - и δ -клеток поджелудочной железы соответственно. При трансплантации иммунодефицитным мышам они образовывали не только гепатоциты и холангиоциты, но и эпителиальные клетки поджелудочной железы и желудка. Интересно отметить, что клетки с вышеописанными свойствами существуют лишь в очень раннем развитии печени (у мыши до 13,5 дней, что соответствует примерно 12 неделям гестации у человека), а затем они не выявляются.

Адрес для корреспонденции: Петренко А.Ю., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Перяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-41-35, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Кроме того, в эмбриональной печени обнаружены мезенхимальные стволовые клетки, также образующие колонии в культуре. Эти клетки способны дифференцироваться в остеоциты, хондроциты, фибробласты и жировые клетки.

Все перечисленные выше претенденты на мультипотентные стволовые клетки в эмбриональной печени, более подробно описанные в [1], являются стромальными и обладают адгезивными свойствами. Наряду с ними в эмбриогенезе печень выполняет кроветворную функцию и характеризуется самым высоким из всех существующих источников содержанием стволовых кроветворных клеток. Гемопозитические клетки не обладают адгезивными свойствами. Таким образом, свойство прикрепления к пластику было использовано нами для грубой оценки вклада гемопозитической и негемопозитической составляющих в клеточный состав эмбриональной печени.

Клетки печени получали из эмбрионов человека 1-го триместра гестации (7-12 недель) после хирургического прерывания беременности при условии письменного согласия донора на использование материала в научных целях. В условиях стерильного бокса печень дезагрегировали на одиночные клетки и криоконсервировали по общепринятым во всем мире протоколам. Было установлено, что жизнеспособность клеток после криоконсервирования зависит от плотности суспензии и снижается при концентрации клеток более 40×10^6 в мл. Поэтому суспензии готовили



Претенденты на стволовые клетки печени в онтогенезе: ССК – стволовая кроветворная клетка, КМ – костный мозг, ЭНТ – энтероцит, ПЖ – поджелудочная железа, ЭСК – эмбриональная стволовая клетка, ОК – овалы клетки, ГЦ – гепатоцит, ЭндСК – эндодермальная стволовая клетка, ГБ – гепатобласт, ХЦ – холангиоцит

таким образом, чтобы плотность клеток в ампуле составляла $20-40 \times 10^6$ в мл.

Содержание кроветворных клеток различного иммунофенотипа в суспензии клеток эмбриональной печени определяли методом проточной цитометрии. Определялись содержание клеток, экспрессирующих CD34 (общий маркер кроветворных клеток-предшественников), CD133 (AC133, новый маркер, наиболее точно выявляющий стволовые кроветворные клетки), CD45 (экспрессируется на лимфоидно-коммитированных клетках-предшественниках), Gly-A (гликофорин-A, маркер клеток эритроидного ряда различной степени зрелости). Содержание CD34⁺ клеток в тотальной суспензии клеток эмбриональной печени составляло 1-2%, а содержание CD45⁺ клеток – 2-4%. Содержание гликофорин А-позитивных клеток составляло почти 90%, содержание CD133⁺ клеток – 0,4-0,7 [2].

Центрифугирование в градиенте плотности Перколла позволило повысить содержание претендентов на стволовые клетки в 3-4 раза. Однако процентное содержание гликофорин А-позитивных клеток изменялось при этом незначительно. Это говорит о том, что в суспензии гемопоэтических клеток эмбриональной печени количество окончательно дифференцированных (безъядерных) эритроцитов невелико, а эритроидные клетки в основном представлены предшественниками различной степени коммитированности. Еще одним косвенным показателем, свидетельствующим в пользу ранней коммитированности эритроидных клеток эмбриональной печени, является их слабое взаимодействие с моноклональными антителами к поверхностным антигенам групповой принадлежности эритроцитов. При инкубации моноклональных антител с КЭП, полученными из эмбрионов до 9 недель гестации, характерной агрегации вообще не наблюдали, а с 9 недели и до 12-й агрегация проявлялась в очень слабом виде.

Стволовые кроветворные клетки и клетки-предшественники были способны образовывать все типы гемопоэтических колоний в присутствии рекомбинантных ростовых факторов. Даже внутри столь узкого коридора эмбриогенеза (внутри 1-го триместа гестации) клеточные суспензии отличаются, причем количество колониеобразующих единиц уменьшается с возрастом. Так, клетки, полученные из более ранних эмбрионов (6-9 недель) образуют большее количество смешанных, наиболее ранних колоний КОЕ-ГЕММ по сравнению с образцами 10-12 недель.

Предшественники лимфоидного ростка в суспензии гемопоэтических клеток печени эмбрионов человека малочисленны: наибольшее

количество (около 3%) составляют CD45-позитивные клетки. Степень функциональной зрелости лимфоидных клеток эмбриональной печени человека оценивали по их способности активировать лимфоциты взрослых доноров в смешанной культуре. Для предотвращения спонтанной пролиферации КЭП обрабатывали митомицином. Взрослые лимфоциты характеризовались слабой спонтанной пролиферацией, однако при сокультивировании с лимфоцитами другого донора или в присутствии митогенов наблюдалась характерная активация включения тимидина. Индекс активации составлял 8-10. В смешанной культуре лимфоцитов взрослых доноров и митомицин-обработанных КЭП активации не наблюдали [3]. Эти данные показывают, что клетки лимфоидного ростка в суспензии КЭП являются не только малочисленными, но и функционально незрелыми.

Как было сказано выше, помимо гемопоэтических клеток в эмбриональной печени содержатся клетки стромального ряда, среди которых особый интерес представляют мезенхимальные и гепатические стволовые клетки. Естественно эти клетки достаточно редкие, панели молекулярных маркеров для них полностью не разработаны, особенно для гепатических клеток. Поэтому, пожалуй, единственной возможностью их выявления служит способность к образованию колоний. Этим свойством мы и воспользовались. Было установлено, что около 50% клеток эмбриональной печени человека прикрепляются к пластику и только в среднем 3 клетки на 10000 прикрепившихся обладают клоногенными свойствами [4]. В настоящее время начата работа по идентификации этих клеток, изучению их дифференцировочного потенциала. Надеюсь, эти данные будут представлены в недалеком будущем.

Если для гемопоэтических клеток панель молекулярных маркеров широко используется в эксперименте и клинике, то для клеток гепатического ряда она разработана недостаточно полно и мало доступна. Нами была предпринята попытка оценить количество гепатических клеток в суспензии КЭП с помощью моноклональных антител "Hepatocyte" (клон OCH1E5). Однако она оказалась безуспешной, очевидно, вследствие отсутствия зрелых гепатоцитов в анализируемых препаратах. В связи с этим потенциал гепатических клеток фетальной печени исследовали в модельных системах патологий печени различной этиологии при трансплантации лабораторным животным. В качестве моделей использовали острую печеночную недостаточность, экспериментальный цирроз, алкогольное поражение печени и гиперхолестеринемию.

Как модель острой печеночной недостаточности использовали отравление тетрахлорметаном и 70%-ную гепатэктомию. При этом рассчитывали на выявление “быстрых” эффектов трансплантации, поскольку сроки наблюдения в такой экспериментальной системе составляют 2-3 дня, а исходное восстановление массы органа происходит за 7 дней. Было установлено, что введение КЭП увеличивало скорость синтеза ДНК через 24 и 72 ч после операции в 2,5 и 2,4 раза соответственно [5]. Исходя из полученных данных, можно предположить, что введение КЭП усиливает не только ДНК-синтетические процессы, но и в целом темпы регенерации в печени крыс. Действительно, введение КЭП приводило к достоверному увеличению степени регенерации печени. Стимуляция восстановления массы органа, наблюдаемая при введении КЭП, сопровождалась соответствующим восстановлением детоксикационной функции печени, оцененной по скорости выведения ксенобиотика гексенала. Введение КЭП крысам, которые впоследствии подвергались острому отравлению тетрахлорметаном, предотвращало гибель животных и приводило к существенному улучшению функциональных показателей печени [6].

Цирроз печени (ЦП) формировали 3-месячным введением малых доз тетрахлорметана. Введение КЭП осуществляли в пульпу селезенки крыс, об активности восстановительных процессов судили по структурному состоянию печени и биохимическим показателям крови через 2 и 4 недели после трансплантации клеток. Наблюдение за экспериментальными животными после операции показало, что восстановительный период тяжело протекал в контрольной группе, где выживаемость животных составила 42%. Введение КЭП эффективно повышало выживаемость животных до 91%. Исследование гистологических срезов цирротически измененной печени крыс контрольной группы через 2 нед после трансплантации выявило значительные структурные изменения паренхимы органа, характерные для экспериментального ЦП. Изучение гистологических срезов печени крыс, которым вводили КЭП, показало появление морфологических признаков, свидетельствующих об активации восстановительных процессов в органе, отмечались проявления внутриклеточной и клеточной регенерации гепатоцитов. Хотя ложные дольки сохранялись, в их составе чаще выявлялись гепатоциты с нормальными тинкториальными свойствами. Встречались целые участки паренхимы, сформированные “молодыми” гепатоцитами со светлой цитоплазмой и увеличенными ядрами, содержащими хроматин и ядрышки.

Исследование биохимического профиля сыворотки крови у животных контрольной группы выявило значительные изменения, свидетельствующие о функциональных и некротических нарушениях печени. Через 1 неделю после операции у животных контрольной группы увеличивалась активность ЛДГ в 2,1 раза и снижалось содержание альбумина в 1,3 раза относительно исходного уровня. Трансплантация КЭП предотвращала увеличение активности ЛДГ, а также приводила к увеличению содержания альбумина в 1,49 раза ($p < 0,05$). Через 2 недели после трансплантации КЭП уровень билирубина в сыворотке крови животных снижался до значений, характерных для показателей нормы – $9,6 \pm 0,8$. Улучшение биохимических показателей крови после введения КЭП сопровождалось восстановлением детоксикационной функции печени, оцененной по содержанию цитохрома Р-450 и способности метаболизировать ксенобиотики. Исследование биоэнергетического состояния печени показало существенное увеличение активности дыхательной цепи митохондрий, что свидетельствует о стимуляции биогенеза митохондрий в результате введения КЭП. Таким образом, на модели ЦП показано, что введение КЭП увеличивает выживаемость животных и приводит к стимуляции восстановительных процессов в патологически измененном органе, что подтверждается данными морфологических и биохимических исследований [7].

Особый интерес вызывает изучение действия КЭП в условиях нарушения специфических метаболических функций печени. Одной из таких экспериментальных патологий является экспериментальная гиперхолестеринемия, при которой алиментарное поступление холестерина приводит к развитию структурно-функционального повреждения ткани печени, в основе которого лежит нарушение липорегуляторной функции гепатоцитов. Модель формировали на половозрелых кроликах-самцах массой 2-3,5 кг путем ежедневного скармливания ХС. Развитие модели отслеживали по изменению содержания ОХС, которое в норме составляло $0,31 \pm 0,17$ ммоль/л. Через месяц скармливания экзогенного холестерина этот параметр увеличивался до $1,98 \pm 0,85$ ммоль/л и в дальнейшем не увеличивался. Через 5 месяцев холестериновой диеты кроликам опытной группы в портальную вену вводили криоконсервированные КЭП, а контрольной – физиологический раствор.

В группе контрольных животных в ответ на оперативное вмешательство на протяжении первой недели после трансплантации происходило 4-кратное увеличение в сыворотке крови концентрации общего ХС с максимумом на 7-е сутки.

В дальнейшем концентрация ХС постепенно снижалась и на 28-е сутки возвращалась к дооперационному уровню, значительно превышая уровень нормы. После трансплантации КЭП наблюдалось значительное снижение уровня ХС в два промежутка времени – на первую неделю (3-7 сутки после трансплантации) и в более отдаленные сроки наблюдения (21-28 сутки). При этом на 28-е сутки у животных, которым трансплантировали КЭП, содержание общего ХС было в 25 раз ниже, чем в контрольной группе, и в 13 раз ниже дооперационного, достигая уровня нормы. Более того, после трансплантации КЭП наблюдалось не только снижение содержания концентрации общего холестерина в сыворотке крови, но и его перераспределение в пользу антиатерогенных липопротеинов [8].

На модели хронического алкогольного поражения печени также показано позитивное действие введенных КЭП. Оно проявлялось в улучшении состояния шерсти крыс, нормализации поведенческих реакций, восстановлении биохимических показателей крови, антиоксидантно-прооксидантного равновесия и морфологического состояния печени. Следует отметить, что улучшение морфофункциональных свойств печени у крыс с модельным алкоголизмом в ответ на введение КЭП наблюдалось после внутривенной инфузии клеток. Такой метод введения существенно отличался от описанных выше моделей гиперхолестеринемии и цирроза, в которых КЭП вводили с расчетом на быструю доставку в печень (внутриселезеночно или внутрипортально). В связи с простотой внутривенной инфузии и соответственно перспективности такого метода введения была предпринята попытка выявить трансплантированные клетки в некоторых тканях животных. Для этого использовали двойное мечение клеток – были отобраны суспензии КЭП мужского пола, зараженные цитомегаловирусом (ЦМВ). Через 2 и 4 недели после внутривенной инфузии самкам крыс с хроническим алкогольным поражением печени используемые маркеры (фрагменты Y-хромосомы и ЦМВ) были обнаружены в костном мозге, селезенке и головном мозге. При этом существенных временных различий в распределении маркеров между тканями не было обнаружено. Отсутствие в печени внутривенно введенных клеток при алкогольном поражении, с одной стороны, свидетельствует о необходимости отработки метода введения клеток при каждой конкретной патологии, а с другой – о том, что для проявления биологического действия клеткам не обязательно оказывать органозаместительный эффект. Можно предположить, что для объяснения позитивного терапевтического эффекта клеток

эмбрионального происхождения необходимо рассматривать два механизма. Один реализуется по органозаместительному механизму, при котором клетки приживляются в органе-мишени, дифференцируются и какое-то время выполняют функцию поврежденных клеток. Другой механизм связан с действием биорегуляторов стволовых клеток и их микроокружения. Конкретные механизмы действия биорегуляторов стволовых клеток требуют дальнейшего изучения. О силе потенциального терапевтического эффекта эмбрионспецифических биорегуляторов свидетельствуют данные об их способности предотвращать гибель животных при острых и хронических поражениях печени [6, 7] и снижать оксидативное повреждение печени в ходе гипотермического хранения и реперфузии [9].

Литература

1. Петренко А.Ю., Грищенко В.И., Оченашко О.В., Петренко Ю.А. Трансплантация стволовых клеток – перспективное направление терапии XXI века. 3. Стволовые клетки печени // Международный медицинский журнал.– 2003.– Т. 9, №3.– С. 121-126.
2. Tarasov A.I., Petrenko A.Yu., Jones R. The osmotic characteristics of human fetal liver-derived hematopoietic stem cell candidates // Cryobiology.– 2004.– Vol. 48, N3.– P. 333-340.
3. Петренко Ю.А., Тарасов А.И., Грищенко В.И., Петренко А.Ю. Влияние криоконсервирования на иммунологическую активность и фенотипический состав лимфоидных клеток эмбриональной печени человека // Пробл. криобиологии.– 2002.– N4.– С. 76-79.
4. Грищенко В.И., Петренко А.Ю., Волкова Н.А., Скоробогатова Н.Г. Колониеобразующая активность фибробластоподобных клеток-предшественников из эмбриональной печени человека в условиях *in vitro* // Доповіді НАН України.– 2005.– №2.– С. 138-141.
5. Оченашко О.В., Божков А.И., Петренко А.Ю. Влияние эмбриональных клеток человека на синтез ДНК и яРНК в регенерирующей печени крыс // Укр. біох. журн.– 2002.– Т. 74, №3.– С. 25-30.
6. Черкашина Д.В., Оченашко О.В., Петренко О.Ю. Захист печінки від гострого отруєння тетрахлорметаном препаратами ембріонального походження // Трансплантологія.– 2003.– Т. 4, №1.– С. 49-50.
7. Ochenashko O., Volkova N., Mazur S. et al. Cryopreserved fetal liver cell transplants support the chronic failing liver in rats with CCl₄-induced cirrhosis // Cell Transplant. (In Press).
8. Лебединський О.С., Черкашина Д.В., Петренко О.Ю. Про можливість корекції гіперхолестеринемії трансплантацією клітин плодової печінки // Трансплантологія.– 2003.– Т. 4, №1.– С. 92-93.
9. Cherkashina D.V., Semenchenko O.A., Grischuk V.P. et al. Supplementation with Fetal-Specific Factors Ameliorates Oxidative Liver Damage during Hypothermic Storage and Reperfusion in a Rat Model // Cell Pres. Techn.– 2005.– Vol. 3, N3.– P. 203-212.