ЗВЕЗДЧАТЫЕ КЛЕТКИ ПЕЧЕНИ СТИМУЛИРУЮТ РЕГЕНЕРАЦИЮ ПЕЧЕНИ КРЫС ПОСЛЕ ЧАСТИЧНОЙ ГЕПАТЭКТОМИИ НА ФОНЕ ПОДАВЛЕНИЯ ПРОЛИФЕРАЦИИ ГЕПАТОЦИТОВ

А.А. Титова [1], Г.Р. Бурганова [1], Э.И. Шарипова [1,2], Г.О. Певнев [1,2], М.О. Мавликеев [1], И.М. Газизов [1,2], А.Р. Галявиева [1,2], А.К. Шафигуллина [1], М.С. Калигин [1], М.А. Титова [1], А.А. Гумерова [1], А.П. Киясов [1]

[1] Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия
[2] Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

Hepatic stellate cells stimulate liver regeneration after partial hepatectomy under inhibition of hepatocyte proliferation

A.A. Titova [1], G.R. Burganova [1], E.I. Sharipova [1,2], G.O. Pevnev [1,2], M.O. Mavlikeev [1], I.M. Gazizov [1,2], A.R. Galyavieva [1,2], A.K. Shafigullina [1], M.S. Kaligin [1], M.A. Titova [1], A.A. Gumerova [1], A.P. Kiassov [1]
[1] Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia
[2] Kazan State Medical University, Kazan, Russia

Большинство фундаментальных исследований в области разработки методов регенеративной медицины для лечения заболеваний печени выполняется с использованием кроветворных и мезенхимальных стволовых клеток. Однако все большее значение приобретает необходимость поиска методов управления процессом регенерации путём стимуляции регионального стволового резерва, а также изучения возможности применения региональных стволовых клеток, в качестве которых все чаще рассматриваются звёздчатые клетки печени. Однако исследования влияния трансплантации этих клеток на течение процесса регенерации при повреждении печени единичны. Ранее мы установили возможность гепатоцитарной дифференцировки этих клеток после трансплантации крысам на модели частичной гепатэктомии. В данной работе проведено изучение регенерации печени крыс после трансплантации звёздчатых клеток животным, перенесшим частичную гепатэктомию с введением 2-ацетиламинофлуорена, блокирующего пролиферацию гепатоцитов. Результаты исследования подтвердили способность введённых клеток дифференцироваться в гепатоцитарном направлении и оказывать стимулирующее влияние на восстановление печени без угрозы ее фиброзирования после их трансплантации крысам, перенесшим частичную гепатэктомию и введение 2-ацетиламинофлуорена.

Ключевые слова: печень, регенерация, дифференцировка, стволовые клетки, звёздчатые клетки печени, трансплантация.

Most of the fundamental studies in the field of developing new methods for treating liver diseases in regenerative medicine are performed with haematopoietic and mesenchymal stem cells. At the same time more and more importance is gaining need for finding new approaches enabling stimulation of regional stem cell compartment and using regional stem cells which are possibly represented by hepatic stellate cells. But studies aimed at their transplantation are rare. Previously, we have established the possibility of these cells to differentiate into hepatocytes after transplantation to rats with partial hepatectomy. In our present research we studied liver regeneration after transplantation of hepatic stellate cells on partial hepatectomy with 2-acetylaminofluorene damage model in rats. 2-acetylaminofluorene blocks hepatocyte proliferation. Results of study confirmed that hepatic stellate cells have the ability to differentiate into hepatocyte and stimulate it's regeneration without the threat of fibrosis after transplantation in rats with partial hepatectomy and administration of 2-acetylaminofluorene.

Key words: liver, regeneration, differentiation, stem cells, hepatic stellate cell, transplantation.

Классической моделью изучения регенерации печени является частичная гепатэктомия (ЧГ). Она была предложена и выполнена у крыс в 1931 г. G.M. Higgins и R.M. Anderson. В этой работе было установлено, что после ЧГ масса печени восстанавливается в течение 1–2 нед. [1]. В дальнейшем при изучении регенерации печени в модели ЧГ были описаны кинетика пролиферативного ответа различных типов клеток [2], закономерности изменения микроархитектоники органа [3], последовательность и уровень вовлечения факторов роста, факторов транскрипции, генов, роль гормонов [4], внеклеточного матрикса [5]. ЧГ также является элементом других моделей повреждения печени, таких как ЧГ на фоне введения 2-ацетиламинофлуорена (ААФ) и «Solt-Farber» модель [6]. В этих моделях происходит более выраженное повреждение печени и активация регионального стволового компартмента. Однако, несмотря на многолетние исследования, локализация и клеточный состав стволового компартмента печени остается дискутабельным. Традиционно рассматриваются 3 возможные точки локализации стволовых клеток печени: канальцы Геринга, перидуктальный и дуктальный компартменты [7]. Все они являются источником так называемых овальных клеток, хотя было показано, что данную популяцию клеток следует относить к гепатобластам [8]. При этом не следует забывать, что фенотипические особенности гепатоцитов также позволяют отнести их к унипотентным стволовым клеткам печени [9]. В последние годы ряд учёных склоняется к точке зрения, что региональными стволовыми клетками органа могут быть звёздчатые клетки печени (ЗКП) [10, 11].

Несмотря на способность печени к восстановлению, в ряде случаев регенераторного потенциала оказывается недостаточно. Рост поражения населения хроническими диффузными заболеваниями печени, развитие учения о стволовых клетках и регенеративной медицины привели к активному поиску доступного клеточного материала для трансплантации в поврежденную печень. Разными авторами было изучено влияние трансплантация клеток пупочного канатика [12], фетальных [13], мезенхимальных [14–19], гемопоэтических стволовых клеток [20, 21] на процессы репаративной регенерации печени. В 2014 г. научной группой P.B. Patil была

e-mail: anjerika@list.ru

проведена пилотная работа по трансплантации ЗКП в модели ЧГ [13].

Целью нашей работы стало изучение регенерации печени крыс после трансплантации трансфицированных геном зелёного флуоресцентного белка (Enhanced Green Fluorescent Protein, EGFP) звёздчатых клеток печени крысам после ЧГ на фоне блокирования пролиферации гепатоцитов ААФ.

Материал и методы

Исследование проведено на белых беспородных крысах-самцах массой 250–300 г, находящихся на стандартном рационе вивария и имеющих свободный доступ к воде. Животные были разделены на 2 группы: I – контрольная группа (крысы с ЧГ и введением ААФ), II группа – крысы с ЧГ и введением ААФ, которым была проведена трансплантация ЗКП. ААФ животным вводили внутрибрюшинно ежедневно за 5 сут. до операции, в день операции введение не проводили, далее ААФ вводили ежедневно до выведения животных из эксперимента.

Выделение ЗКП было проведено методом коллагеназно-проназной перфузии печени с последующим разделением клеток в градиенте плотности гистоденза [22]. Количество выделенных клеток и их жизнеспособность определяли путём подсчёта клеток в камере Горяева при разведении клеточной суспензии в трипановом синем в соотношении 1:10. ЗКП трансфицировали вирусом, несущим ген EGFP, культивировали в течение часа в питательной среде ДМЕМ (Sigma, США) с содержанием 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS, Sigma, США), 146 мг/мл L-глутамина, 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (Sigma, США) в инкубаторе при 37°С и 5% содержании CO_2 во влажной атмосфере. Операцию ЧГ (67%) печени проводили в условиях операционной под эфирным наркозом по методике Хиггенсона и Андерсона [1]. Трансплантацию ЗКП проводили интраоперационно путём введения в воротную вену в дозе 3×10^6 кл./животное.

Из эксперимента животных выводили через 1, 2, 3, 5, 7, 14 сут. после введения клеток, кусочки печени помещали в 10% нейтральный формалин на 0,2 М фосфатном буфере (pH = 7,4) на 24 ч для фиксации и заливали в парафин по стандартной методике. Срезы окрашивали иммуногистохимически с коммерческими антителами к EGFP (клон GSN-24, 1:200, Sigma, США), маркёру миофибробластов α-гладкомышечному актину (α-ГМА, клон 1A4, 1:50, DAKO, США), маркёру гепатобластов и холангиоцитов цитокератину (ЦК) 19 (клон BA-17, 1:200, Santa Crus, США), маркёру гепатобластов α-фетопротеину (АФП, 1:200, Abcam, Великобритания). Иммуногистохимическое окрашивание было проведено с использованием визуализационных систем Novolink фирмы Novocastra (Великобритания), CSA и Envision фирмы Dako (Дания). Контроль специфичности иммуногистохимической реакции проводили путём замены первичных антител неиммунной сывороткой мыши или кролика, а также путём исключения из реакции первичных антител.

Результаты и обсуждение

В первой группе животных ни на одном из экспериментальных сроков не было выявлено клеток, экспрессирующих EGFP. Изучение экспрессии EGFP в срезах печени крыс II группы EGFP-позитивных клеток через сутки после операции не обнаружено, через 2 сут. были выявлены EGFP-позитивные единичные синусоидные клетки перипортально и единичные и сгруппированные гепатоциты (рис. 1А, Б).

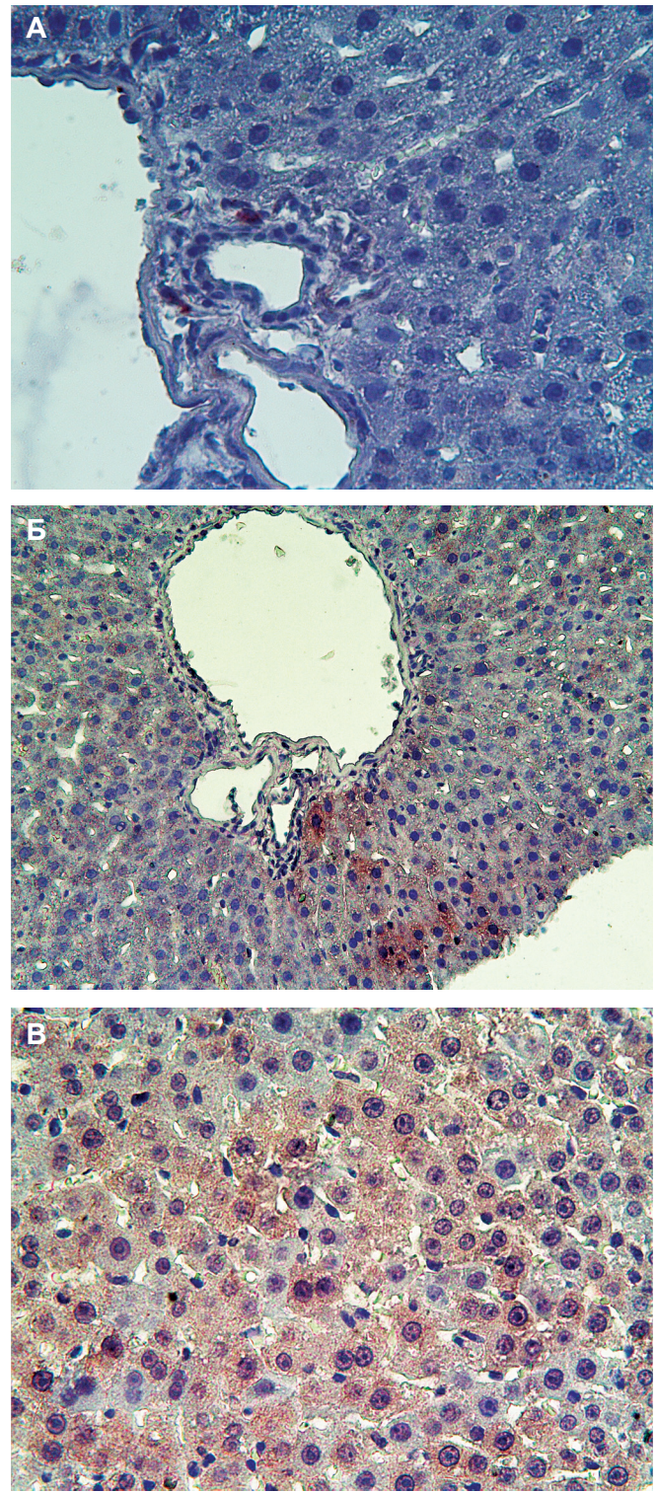

Рис. 1. Печень крысы после ЧГ, введения ААФ и трансплантации EGFP+ЗКП (II группа): А – 2 сут.; Б – 2 сут.; В – 3 сут. Иммуногистохимическая реакция, EGFP+ гепатоциты, продукт реакции красного цвета. Докраска гематоксилином. Ув.: А, В ×400; Б ×200

Максимум экспрессии EGFP наблюдали через 3 сут. (рис. 1В), а затем число позитивных клеток достаточно быстро снижалось. Если сравнить полученные данные с результатами проведённого ранее эксперимента по трансплантации ЗКП крысам после ЧГ без введения ААФ, когда уже через сутки после трансплантации в поле зрения обнаруживалось до 15–20 EGFP-позитивных гепатоцитов [23], обращает на себя внимание некоторое запаздывание дифференцировки трансплантированных клеток. Тем не менее, можно сделать вывод, что дополнительное повреждение печени и подавление пролиферации гепатоцитов ААФ не препятствует дифференцировке трансплантированных клеток в гепатоциты.

Анализ экспрессии ЦК19 в печени животных I группы показал, что на ранних сроках он выявляется только в холангиоцитах, через 2 сут. появляются единичные ЦК19$^+$ клетки в перипортальных областях, такая же картина сохраняется и через 3 сут. К концу 5 сут. такие клетки можно видеть уже и в паренхиме, в перипортальных же зонах на этом сроке отмечается выраженная дуктулярная реакция (увеличение числа протоков, их ветвление, признаки миграции ЦК19$^+$ клеток, рис. 2А). Такая картина сохраняется и в дальнейшем. К 14 сут. ЦК19$^+$ клетки исчезают из паренхимы, тогда как сохраняются признаки дуктулярной реакции и единичные ЦК19$^+$ клетки в перипортальной зоне.

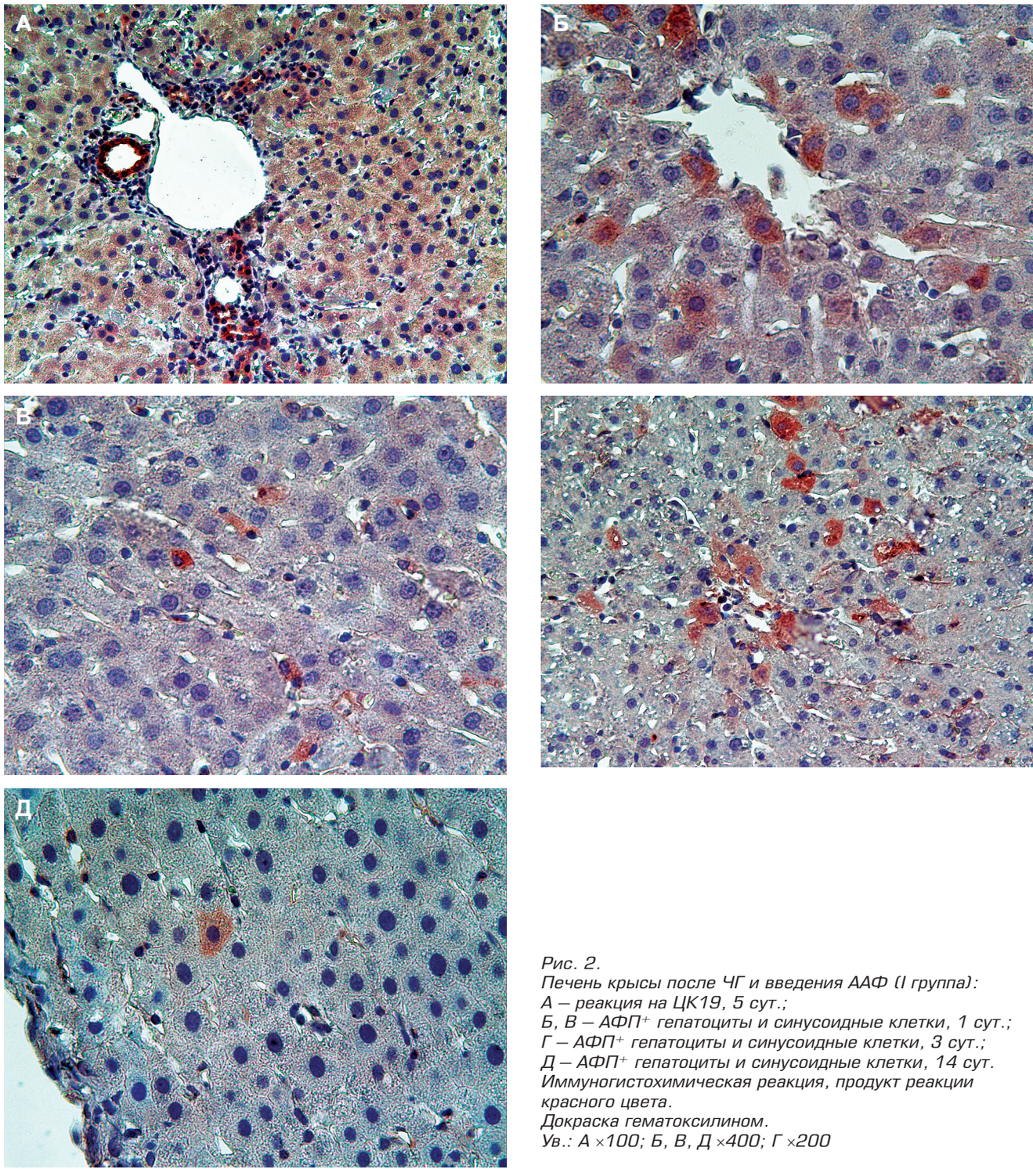

Рис. 2.
Печень крысы после ЧГ и введения ААФ (I группа):
А – реакция на ЦК19, 5 сут.;
Б, В – АФП$^+$ гепатоциты и синусоидные клетки, 1 сут.;
Г – АФП$^+$ гепатоциты и синусоидные клетки, 3 сут.;
Д – АФП$^+$ гепатоциты и синусоидные клетки, 14 сут.
Иммуногистохимическая реакция, продукт реакции красного цвета.
Докраска гематоксилином.
Ув.: А ×100; Б, В, Д ×400; Г ×200

В данной группе через двое суток после операции можно было видеть немногочисленные одиночные и сгруппированные АФП-позитивные гепатоциты в паренхиме и перипортально и АФП-позитивные синусоидные клетки в паренхиме (см. рис. 2Б, В). К 3 сут. число АФП-позитивных гепатобластов несколько увеличивается (рис. 2Г), а затем постепенно снижается. Поскольку ААФ подавляет пролиферацию гепатоцитов, которая в условиях регенерации является одним из основных механизмов восстановления паренхиматозных клеток печени после повреждения, данный факт может указывать на активацию регионального стволового компартмента и начало дифференцировки гепатоцитов из региональных стволовых клеток печени. Наличие экспрессии АФП в синусоидных клетках свидетельствует в пользу возможной локализации региональных стволовых клеток в синусоидах печени. К концу 3 сут. число позитивных гепатоцитов достигает максимума, а затем снижается. После 5 сут. экспрессия АФП сохраняется в синусоидных клетках, также можно видеть единичные АФП-позитивные гепатоциты вплоть до 14 сут. (см. рис. 2Д).

В печени животных группы II на ранних сроках ЦК19 присутствовал только в холангиоцитах и единичных мелких клетках в перипортальных областях, число которых постепенно возрастало к 3 сут. На 5 сут. число таких клеток продолжало расти, и к этому сроку развивалась выраженная дуктулярная реакция: увеличивалось число желчных протоков, отмечено их ветвление и признаки миграции холангиобластов. Далее выраженность дуктулярной реакции снижалась, но отмечалось уменьшение межпортальных расстояний, что подтверждает гипотезу об образовании новых печёночных долек путём деления существующих [22].

Интересно, что в этой группе уже через сутки после операции и введения ЗКП значительная часть гепатоцитов экспрессировала маркёр гепатобластов АФП (рис. 3А).

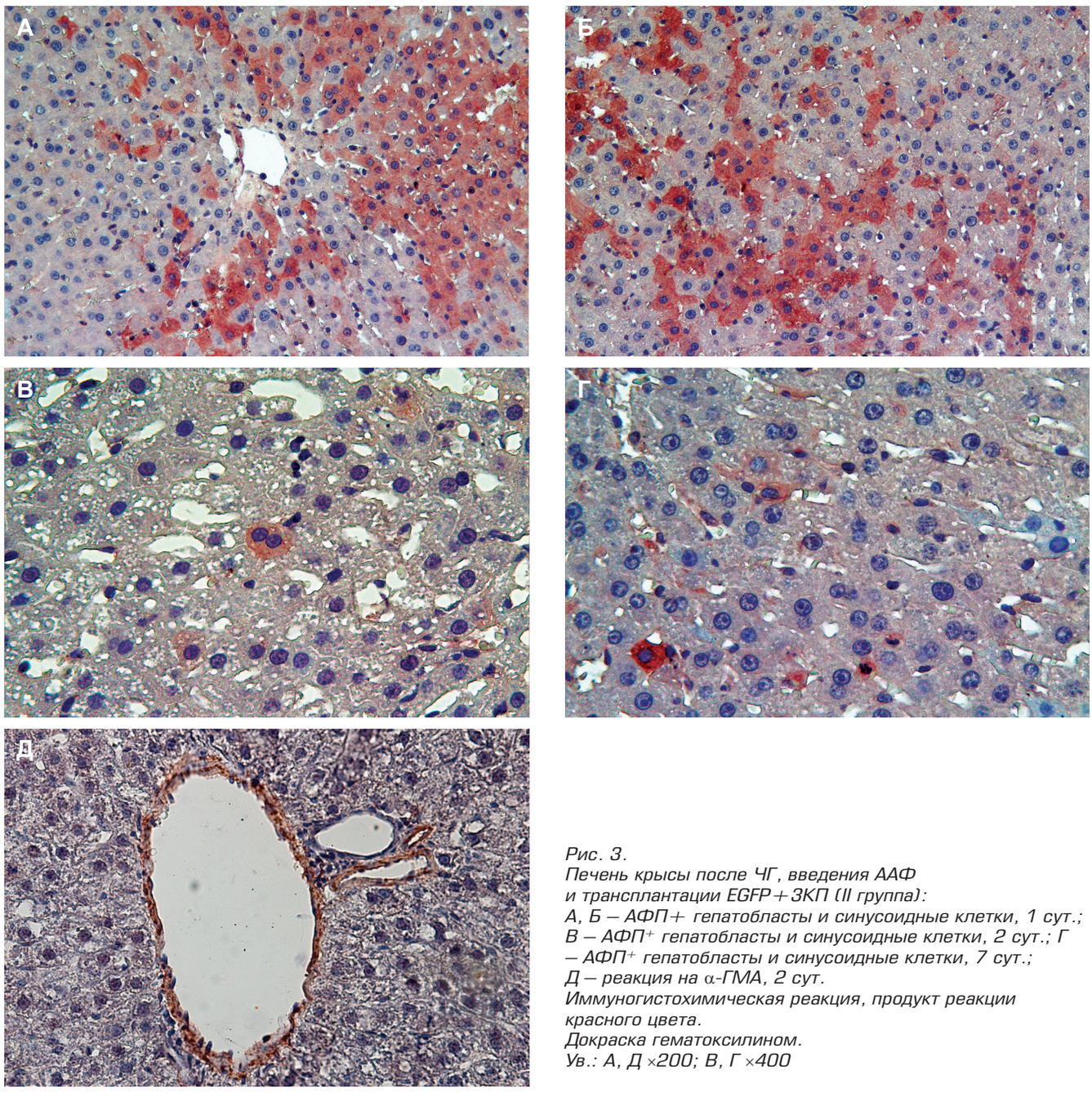

Рис. 3.
Печень крысы после ЧГ, введения ААФ и трансплантации EGFP+ЗКП (II группа):
А, Б – АФП+ гепатобласты и синусоидные клетки, 1 сут.; В – АФП⁺ гепатобласты и синусоидные клетки, 2 сут.; Г – АФП⁺ гепатобласты и синусоидные клетки, 7 сут.; Д – реакция на α-ГМА, 2 сут.
Иммуногистохимическая реакция, продукт реакции красного цвета.
Докраска гематоксилином.
Ув.: А, Д ×200; В, Г ×400

Данные клетки располагались как изолированно от других (мозаично с АФП-негативными гепатоцитами), так и были организованы в кластеры (см. рис. 3А, Б). При этом многие гепатоциты имели два ядра (см. рис. 3В). Наряду с гепатоцитами на всех экспериментальных сроках АФП интенсивно экспрессировали мелкие округлые клетки, расположенные перипортально и в синусоидах, и которые, очевидно, являются гепатобластами, а также сами синусоидные клетки (см. рис. 3Г). Через сутки число позитивных гепатоцитов резко снижалось, по-прежнему были видны позитивные двуядерные гепатоциты и синусоидные клетки, локализующиеся в дольках и перипортально. Далее число АФП-позитивных гепатоцитов продолжало снижаться, и через 2 нед. в печени реципиентов можно было наблюдать лишь синусоидные клетки, экспрессирующие АФП.

Ни на одном из экспериментальных сроков ни в одной группе не было отмечено трансдифференцировки ЗКП в α-ГМА-позитивные миофибробласты. Экспрессия α-ГМА выявлена только в гладкомышечных клетках сосудов печени (см. рис. 3Д). Следовательно, в настоящем эксперименте трансплантация ЗКП не сопровождалась риском развития фиброза печени, связанного с трансплантацией.

Таким образом, выполненные эксперименты по трансплантации ЗКП крысам после ЧГ и введения ААФ подтверждают их способность дифференцироваться в гепатоцитарном направлении. Полученные результаты позволяют также выдвинуть гипотезу о том, что в первые сутки трансплантированные ЗКП в основном стимулируют активацию резидентных региональных стволовых клеток печени реципиентов путем выброса разнообразных факторов роста, таких как фактор роста фибробластов, фактор стволовых клеток, фактор роста гепатоцитов и др. Это приводит к тому, что дифференцирующиеся региональные стволовые клетки, локализованные, вероятнее всего, в синусоидных капиллярах печени, начинают массово экспрессировать маркёры гепатобластов — ЦК19 и АФП. Несколько позднее (2–3 сут., если сопоставить с результатами динамики популяции EGFP-позитивных клеток) к активации стволового компартмента реципиента может присоединяться дифференцировка в гепатоцитарном направлении трансплантированных ЗКП, однако данный процесс уже носит менее выраженный характер. При этом он, вероятно, происходит как за счёт прямой дифференцировки введенных клеток, так и за счёт их слияния с гепатоцитами печени хозяина, в пользу чего косвенно свидетельствует большое число двуядерных EGFP-позитивных гепатоцитов.

Благодарности

Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров» и субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 12-04-97088-р_поволжье_а «Изучение фундаментальных механизмов пластичности и направленной дифференцировки звёздчатых клеток печени для разработки клеточной биомедицинской технологии восстановления гепатоцитов». Работа частично выполнена на оборудовании Междисциплинарного центра коллективного пользования и Научно-образовательного центра фармацевтики Казанского (Приволжского) федерального университета.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Higgins G.M., Anderson R.M. Experimental pathology of the liver: I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. Arch. Pathol. 1931; 12: 186-202.
2. Bucher N.R., Farmer S. Liver regeneration after partial hepatectomy: genes and metabolism. In: Strain A.J., Diehl A., editors. Liver growth and repair. London: Chapman and Hall, 1998; 3-27.
3. Газизов И.М., Калигин М.С., Андреева Д.И. и др. Изменения микроструктуры печени после частичной гепатэктомии у крыс. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2013; VIII (3); 101-5.
4. Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2004; 5: 836-47.
5. Martinez-Hernandez A., Amenta P.S. The hepatic extracellular matrix. II. Ontogenesis, regeneration and cirrhosis. Virchows Arch. Pathol. Anat. Histopathol. 1993; 423: 77-84.
6. Solt D., Medline A., Farber E. Rapid emergence of carcinogen-induced hyperplastic lesions in a new model for the sequential analysis of liver carcinogenesis. Am. J. Pathol.; 1977; 88: 595-609.
7. Sell S. Is there a liver stem cell? Cancer Res. 1990; 50: 3811-5.
8. Гумерова А.А., Киясов А.П. Участие клеток Ито в гистогенезе и регенерации печени. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2007; 2(4): 39-46.
9. Урываева И.В., Цитрин Е.Б., Городецкий С.И. и др. Фенотипические признаки стволовых клеток — экспрессия мембранного транспортера Bcrp1/Abcg2 и экспорт красителя Hoechst 33342 — у гепатоцитов при регенерации печени. Доклады академии наук 2004; 398(3): 422-5.
10. Шафигуллина А.К., Трондин А.А., Бурганова Г.Р. и др. Сравнение различных методов выделения, мечения и трансплантации звёздчатых клеток печени крыс. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2013; 3: 147-51.
11. Kordes C., Sawitza I., Müller-Marbach A. et al. CD133$^+$ hepatic stellate cells are progenitor cells. Biochem Biophys Res Commun. 2007; 52(2): 410-7.
12. Cui L., Shi Y., Zhou X. et al. A set of microRNAs mediate direct conversion of human umbilical cord lining-derived mesenchymal stem cells into hepatocytes. Cell Death Dis. 2013; 4: e918.
13. Patil P.B., Joshi M., Kuna V.K. et al. CD271 identifies functional human hepatic stellate cells, which localize in peri-sinusoidal and portal areas in liver after partial hepatectomy. Cytotherapy 2014; 16(7): 990-9.
14. Kaibori M., Adachi Y., Shimo T. et al. Stimulation of liver regeneration after hepatectomy in mice by injection of bone marrow mesenchymal stem cells via the portal vein. Transplant. Proc. 2012; 44(4): 1107-9.
15. Khuu D.N., Nyabi O., Maerckx C. et al. Adult human liver mesenchymal stem/progenitor cells participate in mouse liver regeneration after hepatectomy. Cell Transplant. 2013; 22(8): 1369-80.
16. Seki T., Yokoyama Y., Nagasaki H. et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell transplantation promotes hepatic regeneration after hepatic ischemia-reperfusion and subsequent hepatectomy in rats. J. Surg. Res. 2012; 178(1): 63-70.
17. Devine S.M., Cobbs C., Jennings M. et al. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. Blood 2003; 101(8): 2999-3001.
18. Campard D., Lysy P.A., Najimi M. et al. Native umbilical cord matrix stem cells express hepatic markers and differentiate into hepatocyte-like cells. Gastroenterol. 2008; 134(3): 833-48.
19. Popp F.C., Slowik P., Eggenhofer E. et al. No contribution of multipotent mesenchymal stromal cells to liver regeneration in a rat model of prolonged hepatic injury. Stem Cells 2007; 25(3): 639-45.
20. Petersen B.E., Bowen W.C., Patrene K.D. et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. Science 1999; 284(5417): 1168-70.
21. Andreeva D., Gazizov I., Yilmaz T. et al. Differentiation of transfected human umbilical cord blood stem cells in the regenerating liver of rats. Abstracts of 45th annual meeting of the European association for the study of the liver. J. Hepatol. 2010; 52: 353-4.
22. Шафигуллина А.К., Гумерова А.А., Трондин А.А. и др. Трансплантированные звёздчатые клетки печени участвуют в регенерации органа после частичной гепатэктомии без риска развития фиброза печени. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2012; 3: 169-72.
23. Газизов И.М., Калигин М.С., Андреева Д.И. и др. Изменения микроструктуры печени после частичной гепатэктомии у крыс. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2013; 3: 101-5.

Поступила: 16.08.2014