

ВЛИЯНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ АУТОЛОГИЧЕСКИХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА МИКРОЦИРКУЛЯЦИЮ ПЕЧЕНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЦИРРОЗЕ ПЕЧЕНИ У КРЫС

Расим Эльхан оглы Джафарли*

Азербайджанский медицинский университет, г. Баку, Азербайджан;

Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака, г. Донецк, Украина

Реферат

DOI: 10.17750/КМЖ2015-198

Цель. Изучение влияния трансплантации аутологических костномозговых мультипотентных стволовых клеток на микроциркуляцию печени при экспериментальной модели её цирротического поражения.

Методы. Использовали 43 белых крысы-самца линии Wistar с массой тела 150–180 г в возрасте не менее 3 мес. Проводили трансплантацию аутологических мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. С учётом летальности животных на этапе моделирования цирроза печени, которая составила 9,3% (4 крысы из 43), в первую группу вошли 19 крыс, у которых трансплантацию стромальных клеток осуществляли в портальную вену, во второй группе (20 крыс) клетки вводили в общую печёночную артерию. Микроциркуляцию печени изучали с помощью лазерной доплеровской флоуметрии и Вейвлет-анализа. Исследования проводили во время операции перед трансплантацией аутологических мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток при моделированном циррозе печени, а также на 8-й неделе лечения.

Результаты. При сформированной модели цирроза печени показатель микроциркуляции был ниже аналогичных показателей животных группы контроля на 24,5% ($p < 0,05$). Во второй группе на 8-й неделе лечения показатель микроциркуляции составил $4,45 \pm 1,2$ пф.ед., что превышало аналогичный показатель первой группы животных на 12,9% ($p < 0,05$) и практически соответствовало норме. Снижение максимальной амплитуды эндотелиальных флаксмоций относительно показателя нормы на 41,9% у животных со сформированным циррозом печени может указывать на апоптоз эндотелиоцитов. На 8-й неделе лечения во второй группе животных максимальная амплитуда нейрогенных флаксмоций составила $0,28 \pm 0,04$ пф.ед., что было статистически значимо выше аналогичного в первой группе животных на 31,04%. Максимальная амплитуда кардиогенных флаксмоций значительно возросла в первой группе животных — на 13,05% в сравнении с аналогичным показателем второй группы животных.

Вывод. Исследование микроциркуляции при помощи метода лазерной доплеровской флоуметрии в динамике лечения животных с моделированным циррозом печени указывает на преимущества интраартериальной трансплантации аутологических мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток.

Ключевые слова: цирроз печени, стволовые клетки, микроциркуляция печени.

EFFECT OF AUTOLOGOUS MESENCHYMAL PLURIPOTENT STEM CELLS TRANSPLANTATION ON LIVER MICROCIRCULATION IN RATS WITH EXPERIMENTAL LIVER CIRRHOSIS

R.E. Dzharfali

Azerbaijan Medical University, Baku, Azerbaijan;

Institute of Urgent and Reconstructive Surgery named after V.K. Gusak, Donetsk, Ukraine

Aim. To study the effect of autologous bone marrow pluripotent stem cells transplantation on liver microcirculation in experimental model of liver cirrhosis.

Methods. 43 white Wistar male rats with body weight of 150–180 g aged at least 3 months were used, in which autologous pluripotent mesenchymal stromal cells transplantation was performed. Considering the animals mortality at the cirrhosis modeling stage, which was 9.3% (4 out of 43 rats), the first group included 19 rats in which stromal cells were transplanted into the portal vein; in the second group (20 rats) the cells were injected into the common hepatic artery. Liver microcirculation was studied using laser Doppler flowmetry and wavelet analysis. Examinations were performed during the operation prior to autologous pluripotent mesenchymal stromal cells transplantation in rats with experimental liver cirrhosis, as well as on the 8th week of treatment.

Results. In modeled liver cirrhosis, the microcirculation index was decreased by 24.5% ($p < 0.05$) compared to animals of the control group. In the second group at the 8th week of treatment, the microcirculation index was 4.45 ± 1.2 perfusion units, which was higher by 12.9% ($p < 0.05$) compared to the first group of animals and almost in line with the normal ranges. Reduction of the maximum amplitude of endothelial flaxmotions compared to normal level by 41.9% in animals with modeled liver cirrhosis may indicate apoptosis of endothelial cells. At the 8th week of treatment, the maximum amplitude of neurogenic flaxmotions in the second group of animals was 0.28 ± 0.04 perfusion units, that was statistically significantly higher by 31.04% compared to the first group of animals. The maximum amplitude of cardiogenic flaxmotions increased significantly in the first group of animals — by 13.05% compared to the same indicator of the second group of animals.

Conclusion. The repeated studies of microcirculation based on laser Doppler during the treatment of animals with experimental liver cirrhosis indicates the advantages of intra-arterial autologous multipotent mesenchymal stromal cells transplantation.

Keywords: liver cirrhosis, stem cells, liver microcirculation.

Цирроз печени (ЦП) до настоящего времени остаётся актуальной проблемой современной медицины, что связано с ростом

числа больных и высокой смертностью [5, 9]. Так, по данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодно в мире от ЦП погибают более 300 000 человек [1, 2].

Некоторые авторы указывают, что один

из важных патогенетических механизмов при развитии ЦП – нарушение органной и системной гемодинамики [1, 8].

Расстройству микроциркуляции при ЦП могут способствовать различные причины, наиболее важные из которых – гипербилирубинемия, гипербилиоацидемия, аутоиммунная агрессия с выделением большого количества провоспалительных молекул, цитокинов, пруритогенов, с травмой эндотелия, а также возникновение портосистемных коллатералей и гипердинамического типа кровообращения на фоне портальной гипертензии [3, 8].

Поддержание органной микроциркуляции служит важным звеном комплексного лечения ЦП [3, 6].

В последние годы увеличилось число публикаций, посвящённых изучению и внедрению в практику трансплантации стволовых клеток при лечении ЦП [9]. Некоторые исследователи считают применение стволовых клеток альтернативой органной трансплантации [4, 10]. Уже получены первые результаты, которые делают актуальным проведение дальнейших исследований в этой области.

Появились новые отечественные разработки инструментальных методов исследования микроциркуляции. Возможности этих методов недостаточно изучены в гепатологии, в частности при хроническом гепатите и ЦП.

В аспекте изучения органной микроциркуляции наше внимание привлекли возможности лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ), основанной на зондировании тканей лазерным излучением с последующей регистрацией излучения, которое отражается от форменных элементов крови в сосудах мелкого калибра [3].

Цель работы – изучение влияния трансплантации аутологических костномозговых мультипотентных стволовых клеток на микроциркуляцию печени при экспериментальной модели её цирротического поражения.

Исследование было выполнено в Международном центре клеточного культивирования института неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака (Национальная академия медицинских наук Украины), а также в Научно-исследовательском центре Азербайджанского медицинского университета.

В экспериментах использовали 43 белых крысы-самца линии Wistar. Масса тела исследуемых животных составляла 150–180 г, возраст был не менее 3 мес.

Эксперименты на животных проводили

в соответствии с правилами «Европейской конвенции защиты позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях».

Получение аутологических мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (АММСК). АММСК выделяли из костного мозга бедренной кости после ампутации нижней конечности животного до начала формирования модели ЦП и портальной гипертензии. В качестве анестезии использовали кетамин в дозе 90 мг/кг массы тела животного.

После ампутации конечности крысы пунктировали нижний диафиз бедренной кости через поверхность коленного сустава и осуществляли стерильную промывку полости фосфатно-солевым буфером Дульбекко. Полученную суспензию разбавляли раствором Хенкса («Биолот», Россия) в соотношении 1:2,5. Центрифужные пробирки ёмкостью 5 мл заполняли раствором Histopaque 1077 («Sigma», США), на который настилали разбавленный костный мозг (в соотношении 1:1) и центрифугировали при комнатной температуре в режиме 1800–2000 об./мин в течение 30–40 мин. Образовавшееся интерфазное кольцо с ядродержащими клетками костного мозга промывали раствором Хенкса и осаждали центрифугированием при 800–1000 об./мин в течение 8–10 мин. Процедуру отмывки повторяли 3 раза. Образовавшийся осадок смешивали с ростовой средой, содержащей смесь модифицированной по способу Дульбекко среды Игла и субстрата Хэма F-12 (DMEM/F12, «Sigma», США), 20% эмбриональной телячьей сыворотки («Биолот», Россия), митогенов. Затем высевали на пластиковые флаконы площадью 75 см² («Nuclon», США) с плотностью 1–2×10⁵ клеток/см² и помещали в CO₂-инкубатор (37 °С, 5% CO₂).

Через 3 сут среду DMEM/F12 меняли на среду Дульбекко, модифицированную по способу Исков (IMDM), с 10% эмбриональной телячьей сывороткой, 2 мМ L-глутамин и 10⁻⁴М 2-меркаптоэтанол («Sigma», США), удаляя не прикрепившиеся (гемопозитические) клетки, и культивировали полученные ММСК в течение 42 дней. Обязательным было исследование биоматериала на стерильность по отношению к возможной бактериальной либо вирусной контаминации.

Полученные клетки замораживали и хранили в криоконтейнере в среднем в течение 52±3,6 дня. Непосредственно перед трансплантацией ММСК размораживали.

Моделирование ЦП. Через 15 дней после

Результаты лазерной доплеровской флоуметрии, полученные на этапах лечения исследуемых животных аутологическими костномозговыми мультипотентными стволовыми клетками (АММСК), $M \pm m$

Параметры ЛДФ, пф.ед.	Моделированный цирроз печени	Через 8 нед после трансплантации АММСК		Контроль, n=10
		Первая группа	Вторая группа	
Показатель микроциркуляции	3,42±0,03	3,94±0,07	4,45±1,2*	4,53±1,8
AmaxE	0,18±0,05	0,23±0,04	0,28±0,04*	0,31±0,04
AmaxM	0,23±0,07	0,25±0,03	0,36±0,05	0,34±0,02
AmaxN	0,24±0,04	0,29±0,02	0,38±0,07*	0,39±0,07
AmaxR	0,18±0,07	0,19±0,05	0,24±0,07*	0,27±0,03
AmaxC	0,19±0,06	0,26±0,03	0,23±0,02	0,44±0,06

Примечание: * $p < 0,05$ по сравнению с первоначальными показателями в модели цирроза печени; ЛДФ – лазерная доплеровская флоуметрия; AmaxE – максимальная амплитуда эндотелиальных флаксмоций; AmaxM – максимальная амплитуда миогенных флаксмоций; AmaxN – максимальная амплитуда нейрогенных флаксмоций; AmaxR – максимальная амплитуда дыхательных флаксмоций; AmaxC – максимальная амплитуда кардиогенных флаксмоций.

ампутации нижней конечности у животных моделировали ЦП путём подкожного введения CCl_4 в виде 50% масляного раствора из расчёта 0,3 мл на 100 г массы тела животного 2 раза в неделю в течение 12 нед. Животных содержали в условиях вивария при свободном доступе к пище и воде на рационе питания, соответствующем нормативам.

Летальность среди наблюдаемых животных на этапе моделирования ЦП составила 9,3% (4 крысы из 43).

Трансплантация ММСК. Мы сочли целесообразным изучить эффективность внутрипортального и внутриартериального (в общую печёночную артерию) введения АММСК.

Для сравнительной оценки изучения эффективности способов трансплантации АММСК наблюдаемые животные были разделены на две группы: в первую группу вошли 19 крыс, у которых трансплантацию АММСК осуществляли в портальную вену; во второй группе животных (20 крыс) АММСК вводили в общую печёночную артерию.

Перед трансплантацией в качестве анестезии использовали кетамин в дозе 90 мг/кг и ксилазина гидрохлорид в дозе 90 мг/кг массы тела животного.

Введение АММСК в общую печёночную артерию либо портальную вену осуществляли лапаротомией путём однократной инъекции 1 мл взвеси клеток из расчёта $2,0 \times 10^6$ клеток на 100 г массы тела животного с помощью инсулинового шприца с иглой 0,4×8 мм.

Общая летальность среди животных при внутрипортальном (3 крысы, 15,8%) и внутриартериальном (2 крысы, 10%) введении составила 12,8%. Причиной летального исхода в 3 случаях было интраоперационное кро-

вотечение, возникшее на месте инъекции: у 1 (5%) крысы – при внутриартериальном введении, у 2 (10,5%) крыс – при внутрипортальном введении. В 1 (5,3%) случае летальный исход наступил у животного из первой группы вследствие тромбоза воротной вены, который был выявлен при вскрытии животного на 2-е сутки после трансплантации АММСК.

В остальных случаях кровотечение в месте инъекции при внутрипортальном или внутриартериальном введении останавливали при помощи гемостатической губки.

Исследование органной микроциркуляции. Лазерную доплеровскую флоуметрию выполняли на аппарате ЛАКК-01 (Россия) со встроенным программным обеспечением, позволяющим анализировать полученные данные в автоматизированном режиме при помощи Вейвлет-анализа.

Лазерную доплеровскую флоуметрию осуществляли во время операции перед трансплантацией АММСК при моделированном ЦП, а также на 8-й неделе лечения путём помещения датчика непосредственно в область правой доли печени. На втором этапе органную микроциркуляцию также исследовали при помощи лапаротомии, после чего животных декапитировали.

Изучали следующие параметры:

- показатель микроциркуляции (перфузионные единицы – пф.ед.);
- активные механизмы регуляции микроциркуляции: AmaxE – максимальная амплитуда эндотелиальных флаксмоций; AmaxM – максимальная амплитуда миогенных флаксмоций; AmaxN – максимальная амплитуда нейрогенных флаксмоций;
- пассивные механизмы: AmaxR – мак-

симальная амплитуда дыхательных флуксуций; АmaxС – максимальная амплитуда кардиогенных флуксуций [6].

В связи с отсутствием в литературе данных, характеризующих показатели органной микроциркуляции печени в норме (методом лазерной доплеровской флоуметрии), мы в качестве группы контроля использовали 10 здоровых крыс линии Wistar. У крыс этой группы при лапаротомии исследовали показатели в норме, после чего животных декапитировали с последующим выведением из эксперимента.

Полученные цифровые данные подвергли статистической обработке с помощью программы Microsoft Excel 2007 с использованием вариационной статистики, критерия χ^2 .

При изучении показателей микроциркуляции печени и данных Вейвлет-анализа в группе контроля, а также при моделированном ЦП отмечены статистически значимые различия (табл. 1).

При сформированной модели ЦП показатель микроциркуляции был ниже аналогичных показателей животных группы контроля на 24,5% ($p < 0,05$). Данное обстоятельство совпадает с литературными данными [3] и свидетельствует о значимых нарушениях органной микроциркуляции при ЦП.

Снижение АmaxЕ относительно показателя нормы на 41,9% у животных на стадии сформированного ЦП может указывать на апоптоз эндотелиоцитов. Результаты Вейвлет-анализа демонстрируют нарушения нейрогенных и миогенных механизмов регуляции микроциркуляции, что соответствует патогенезу ЦП. Данное обстоятельство сопровождается окклюзией микроциркуляции, нарастанием интерстициального отёка и ухудшением метаболизма гепатоцитов.

АmaxR при сформированной модели ЦП была также статистически значимо снижена в сравнении с группой контроля – на 33,3%. Данное обстоятельство характерно для нарушений веноулярного оттока в микроциркуляторном русле.

В модели ЦП у животных наблюдалось снижение АmaxС до $0,19 \pm 0,06$ пф.ед., что было ниже показателя нормы на 56,8% ($p < 0,05$). Данное обстоятельство мы объясняем компенсаторными механизмами: в ответ на выраженное затруднение веноулярного оттока для защиты микроциркуляторного русла от перенаполнения (при портальной гипертензии на фоне ЦП) повышается тонус прекапилляров и артериол, что сопро-

вождается уменьшением притока крови в систему [5].

Показатели АmaxN и АmaxM у животных с моделированным ЦП до начала лечения стволовыми клетками были статистически значимо ниже аналогичных группы контроля – соответственно на 38,5 и 32,4%. Данное обстоятельство оценивается как угнетение эндотелиальной активности сосудов микроциркуляторного русла.

По данным Вейвлет-анализа, проведённого на 8-й неделе после трансплантации АММСК, показатели в первой и второй группах статистически значимо различались. Так, во второй группе животных значение АmaxN составило $0,28 \pm 0,04$ пф.ед., что было выше аналогичного в первой группе животных на 31,04% ($p < 0,05$). Показатель же АmaxС значительно возрос в первой группе животных – на 13,05% в сравнении с аналогичным второй группы животных.

Показатель микроциркуляции во второй группе больных на 8-й неделе лечения АММСК составил $4,45 \pm 1,2$ пф.ед. Он был выше аналогичного первой группы животных на 12,9% ($p < 0,05$) и практически совпал с нормой.

Как видно из табл. 1, статистически значимое повышение во второй группе животных амплитуды эндотелиальных и миогенных флуксуций в сравнении с первой группой свидетельствует о более выраженных эндотелиопротективных изменениях в печени, возникших после интраартериальной трансплантации АММСК.

По результатам Вейвлет-анализа у исследуемых животных на 8-й неделе после трансплантации АММСК отмечалось увеличение показателей АmaxЕ и АmaxN.

Наглядная положительная динамика во второй группе животных обусловлена более выраженным уменьшением агрегации и адгезии тромбоцитов, повышением эластичности эритроцитов и снижением вязкости крови. Статистически значимое увеличение показателя АmaxС в обеих группах животных мы связываем с изменениями проницаемости сосудистой стенки за счёт активации синтеза простаглицлина, а также с уменьшением повышенного ранее сосудистого тонуса. Однако на 8-й неделе после трансплантации АММСК данный показатель кардиогенных флуксуций был ниже показателя контроля на 47,7%. Данное обстоятельство свидетельствует о сохранении в указанные сроки лечения повышенного тонуса артериол и прекапилляров в микро-

циркуляторном русле паренхимы печени.

Отсутствие статистически значимого повышения показателя АmaxM в первой группе крыс в сравнении с аналогичным показателем второй группы свидетельствует о сохраняющейся слабости миогенных механизмов регуляции микроциркуляции, что может быть связано с угнетением транспорта ионов кальция через «медленные» каналы клеточных мембран.

У животных обеих групп на 8-й неделе после интрапортальной трансплантации АММСК повышался показатель АmaxR до $0,19 \pm 0,05$ пф.ед., однако лишь у крыс второй группы разница была статистически значима. В указанные сроки исследования данный показатель превышал аналогичный показатель первой группы животных на 26,3%, что свидетельствует о более интенсивном улучшении веноулярного оттока в микроциркуляторном русле печени.

Аналогичную тенденцию мы наблюдали и по показателю АmaxE. Так, на 8-й неделе лечения во второй группе животных он превышал аналогичный показатель первой группы на 21,7%. Соответствие данного показателя нормативам свидетельствует о более интенсивном эндотелиоцитопротективном, а также антицитотоксическом воздействии интраартериальной трансплантации АММСК.

ВЫВОД

Исследования микроциркуляции методом лазерной доплеровской флоуметрии в динамике лечения животных с моделированным циррозом печени показывают преимущества использования интраартериальной трансплантации аутологических мультиморфных мезенхимальных стромальных клеток. По нашему мнению, это связано с морфофункциональными изменениями паренхимы печени на фоне повышенного индекса застоя в портальной вене, а также уменьшением индекса резистентности общей печёночной артерии. По-

лученные результаты указывают на перспективность исследований в этой области.

ЛИТЕРАТУРА

1. Подымова С.Д. Болезни печени. — М.: Медицина, 2005. — 768 с. [Podymova S.D. *Bolezni pecheni*. (Liver diseases.) Moscow: Meditsina. 2005; 768 p. (In Russ.)]
2. Садовникова И.И. Циррозы печени. Вопросы этиологии, патогенеза, клиники, диагностики, лечения // Рус. мед. ж.: Бол. органов пищеварен. — 2003. — Т. 5, №2. — С. 38–42. [Sadovnikova I.I. Liver cirrhosis. The questions of etiology, pathogenesis, clinical picture, diagnosis and treatment. *Russkiy meditsinskiy zhurnal: Bolezni organov pishchevareniya*. 2003; 5 (2): 38–42. (In Russ.)]
3. Хок М.М., Левитан Б.Н., Чалов В.В., Бредихин М.В. Исследование микроциркуляции кожи методом лазерной доплерофлоуметрии при хронических диффузных заболеваниях печени (ХДЗП) // Рос. ж. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. — 2008. — Т. 18, №1. — С. 14. [Khok M.M., Levitan B.N., Chalov V.V., Bredikhin M.V. Examination of skin microcirculation by laser flow Doppler in chronic diffuse liver diseases. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii*. 2008; 18 (1): 14. (In Russ.)]
4. Jang Y., Kim M., Cho M. et al. Effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on hepatic fibrosis in a thioacetamide-induced cirrhotic rat model // *BMC Gastroenterol.* — 2014. — Vol. 14, N 1. — P. 198.
5. Kharaziha P., Hellström P., Noorinayer B., Farzaneh F. Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: a phase I-II clinical trial // *Eur. J. Gastroenterol. Hepatology.* — 2009. — Vol. 21, N 10. — P. 1199–1205.
6. Lee S., Kim K., Park K. Mechanisms of fibrogenesis in liver cirrhosis: the molecular aspects of epithelial-mesenchymal transition // *J. Hepatol.* — 2014. — Vol. 27, N 4. — P. 207–216.
7. Motawi T., Atta H., Sadik N., Azzam M. The therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and simvastatin in a rat model of liver fibrosis // *Cell. Biochem. Biophys.* — 2014. — Vol. 68, N 1. — P. 111–125.
8. Wang Y., Lian F., Li J. et al. Adipose derived mesenchymal stem cells transplantation via portal vein improves microcirculation and ameliorates liver fibrosis induced by CCl₄ in rats // *J. Transl. Med.* — 2012. — Vol. 26. — P. 133–141.
9. Xu L., Gong Y., Wang B. et al. Randomized trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cells transplantation for hepatitis B virus cirrhosis: regulation of Treg/Th17 cells // *J. Gastroenterol. Hepatol.* — 2014. — Vol. 29, N 8. — P. 1620–1628.
10. Yuan S., Jiang T. Use of bone mesenchymal stem cells to treat rats with acute liver failure // *Genet. Mol. Res.* — 2014. — Vol. 30. — P. 13.