

УДК 616.36-004-076:611-013.385

DOI: 10.35693/2500-1388-2020-5-3-197-203

Использование клеточных технологий в лечении цирроза печени (оценка эффективности и способ визуализации введенных аутологичных мезенхимальных стволовых клеток)

И.Е. Коткас¹, Н.И. Енукашвили^{1, 2}, Ш.М. Асадулаев¹, А.В. Чубарь²¹ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия)²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт цитологии Российской академии наук» (Санкт-Петербург, Россия)

Аннотация

В клиническом наблюдении представляется оценка эффективности использования аутологичных мезенхимальных стволовых клеток в лечении цирроза печени алиментарной этиологии. Для определения локализации вводимых клеточных структур предварительно проводилось мечение стволовых клеток наночастицами оксида железа (II, III). Клеточные структуры, отмеченные наночастицами оксида железа, были визуализированы в организме человека при помощи МРТ. Через 6 месяцев после проведения клеточной терапии у пациента были оценены показатели клинического и биохимического анализов крови, данные MEGX-теста, показатели эластографии и теста субъективной оценки самочувствия. После проведения клеточной терапии отмечалось улучшение показателей всех вышеперечисленных методов исследования. Также через 6 и 12 месяцев после лечения была выполнена биопсия печени из области, где были визуализированы введенные ранее стволовые клетки. При гистологическом исследовании биоптатов печени, полученных из области трансплантации МСК, наибольшее количество меченых клеток наблюдали в микроузлах печени, а также на границах микроузлов и фиброзных септ. Часть биоптата, полученного через 12 месяцев после трансплантации, использовали для получения первичных культур. До первого посева культур в них выявляли колонии клеток как фибробластоподобной морфологии, так и эпителиальной. Оба типа колоний содержали частицы. Проведение клеточной терапии пациенту с циррозом печени алиментарной этиологии способствовало улучшению показателей лабораторных и инструментальных методов исследования.

Процедура была перенесена пациентом удовлетворительно, каких-либо осложнений выявлено не было.

Ключевые слова: клеточные технологии, лечение цирроза печени, визуализация стволовых клеток в организме человека.

Конфликт интересов: не заявлен.

Для цитирования:

Коткас И.Е., Енукашвили Н.И., Асадулаев Ш.М., Чубарь А.В. Использование клеточных технологий в лечении цирроза печени (оценка эффективности и способ визуализации введенных аутологичных мезенхимальных стволовых клеток). Наука и инновации в медицине. 2020;5(3):197-203

doi: 10.35693/2500-1388-2020-5-3-197-203

МСК – мезенхимальная стромальная клетка;

МРТ – магнитно-резонансная томография.

Сведения об авторах

Коткас И.Е. – к.м.н., доцент кафедры факультетской хирургии им. И.И. Грекова, зав. хирургическим отделением клиники им. Э.Э. Эйхвальда.

ORCID: 0000-0003-4605-9887

Енукашвили Н.И. – к.б.н., старший научный сотрудник.

ORCID: 0000-0002-5971-7917

Асадулаев Ш.М. – к.м.н., врач-хирург рентгеноэндоскопического кабинета.

ORCID: 0000-0002-1915-1250

Чубарь А.В. – м.н.с. лаб. некодирующей ДНК. ORCID: 0000-0002-4160-1385

Автор для переписки

Коткас Инна Евгеньевна

Адрес: СЗГМУ им. И.И. Мечникова, ул. Кирочная, 41,

г. Санкт-Петербург, Россия, 191015.

E-mail: inna.kotkas@yandex.ru

Тел.: +7 (921) 948 29 94.

Рукопись получена: 30.06.2020

Рецензия получена: 02.08.2020

Решение о публикации принято: 24.08.2020

Autologous mesenchymal stem cells in treatment of liver cirrhosis: evaluation of effectiveness and visualization method

Inna E. Kotkas¹, Natella I. Enukashvili^{1, 2}, Shamil M. Asadulayev¹, Anna V. Chubar²¹North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov (Saint Petersburg, Russia)²Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences (Saint Petersburg, Russia)

Abstract

Through clinical observation, we present an assessment of the autologous mesenchymal stem cells effectiveness in treatment of liver cirrhosis of alimentary etiology. In order to determine the localization of the implanted cell structures, the stem cells were previously labeled with iron (II, III) oxide nanoparticles (IONPs). Further MRI visualization helped to detect the cell structures stained with iron oxide nanoparticles in the human body. In 6 months after the cell therapy, the patient underwent clinical and biochemical blood

tests, MEGX test, elastography and subjective health assessment test. The tests data analysis revealed the improvement of the values of all examined parameters after the cell treatment. Also in 6 and 12 months after the treatment, a liver biopsy was performed from the area where the implanted stem cells were visualized. In histological examination of liver biopsates obtained from the area of MSC transplantation, the largest number of stained cells was observed in liver micronodes, as well as at the boundaries of micronodes and fibrous septa. A portion of the

bioptate obtained in 12 months after transplantation was used to produce primary cell cultures. Before the first re-seeding of the cultures, cell colonies of both fibroblast-like morphology and epithelial were detected in them. Both types of colonies contained the particles.

Conducting the cell therapy to a patient with liver cirrhosis of alimentary etiology contributed to improving the laboratory and instrumental examinations indicators. The patient had come through the treatment procedure satisfactorily, no complications were registered.

Keywords: cell technologies, treatment of liver cirrhosis, visualization of stem cells in the human body.

Conflict of interest: nothing to disclose.

Citation

Kotkas I.E., Enukashvili N.I., Asadulaev Sh.M., Chubar A.V. **Autologous mesenchymal stem cells in treatment of liver cirrhosis: evaluation of effectiveness and visualization method.** *Science & Innovations in Medicine.* 2020;5(3):197-203 doi: 10.35693/2500-1388-2020-5-3-197-203

Information about authors

Inna E. Kotkas – PhD, Associate Professor, Department of Faculty surgery named after I.I. Grekov, Head of the Department of surgery in the E.E. Eichwald clinic. ORCID: 0000-0003-4605-9887

Natella I. Enukashvili – PhD, Biology, senior researcher. ORCID: 0000-0002-5971-7917

Shamil M. Asadulaev – PhD, surgeon of the x-ray endovascular office. ORCID: 0000-0002-1915-1250

Anna V. Chubar – junior research associate of the Laboratory of non-coding DNA. ORCID: 0000-0002-4160-1385

Corresponding Author

Inna E. Kotkas

Address: I.I. Mechnikov NWSMU, 41 Kirochnaya st., Saint Petersburg, Russia, 191015.

E-mail: inna.kotkas@yandex.ru

Phone: +7 (921) 948 29 94.

Received: 30.06.2020

Revision Received: 02.08.2020

Accepted: 24.08.2020

■ ВВЕДЕНИЕ

Повреждение печеночной ткани в результате воздействия различных агентов (алкоголь, вирусы, лекарственные препараты и т.д.) стимулирует процесс образования соединительной ткани в печени и приводит к формированию фиброза и/или цирроза печени [1]. Заболеваемость циррозом печени растет ежегодно и в экономически развитых странах составляет от 20 до 40 человек на 100 тысяч населения. Цирроз печени занимает девятое место среди причин летальных исходов, при этом чаще данный диагноз ставится мужчинам (соотношение мужчин и женщин 3:1). По данным различных источников, цирроз печени алкогольной этиологии составляет от 40% до 80% от всех циррозов печени. На долю циррозов печени, развившихся на фоне вирусных гепатитов, приходится от 30% до 40%. Также существует категория больных (10–35%), у которых этиология цирроза печени так и остается неизвестной [2].

Основная терапия при циррозе печени связана с устранением причины возникновения цирроза печени, а также с влиянием на имеющиеся симптомы у пациентов [3]. Однако известно, что имеющаяся на данный момент терапия не дает значимо эффективного результата, а выполнение ортотопической пересадки печени все еще является достаточно сложной и дорогостоящей операцией. В связи с этим возникает потребность в поисках альтернативных методов лечения, одним из которых является использование клеточных технологий в лечении цирроза печени.

На сегодняшний день существует большое количество научных сообщений о применении стволовых клеток в лечении различных заболеваний, в том числе и при диффузных заболеваниях печени. Однако четкое представление о распределении вводимых клеточных структур в большинстве случаев существует лишь на уровне экспериментальных моделей. При этом ни у кого не возникает сомнений в том, насколько важно не только оценивать эффективность клеточной терапии, но и понимать, как происходит распределение введенных стволовых клеток в организме пациента.

В данной статье мы демонстрируем собственное клиническое наблюдение, в котором описывается эффективность применения аутологичных мезенхимальных стволовых клеток в терапии цирроза печени, а также представляем возможность визуализации вводимых

клеточных структур с последующим цитологическим подтверждением.

■ ЦЕЛЬ

Оценить эффективность использования клеточных технологий в лечении цирроза печени, визуализировать вводимые стволовые клетки в организме человека.

■ МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Получение первичных культур мезенхимальных стромальных клеток (МСК) жировой ткани

Все клинические процедуры и забор биологического материала осуществлялись в соответствии с этическими стандартами локального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Первичные культуры мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани выделяли методом ферментации из фрагментов жировой ткани, полученных хирургическим путем. Забор ткани осуществлялся при наличии информированного согласия пациента. Фрагмент ткани механически измельчали, промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) и затем инкубировали в 0,1% раствором коллагеназы I и IV типов (Sigma, США) в течение 30 минут при 37°C (Thermofisher, USA). Полученную клеточную смесь затем центрифугировали (400g, 10 минут) и ресуспендировали клетки стромально-васкулярной фракции в культуральной среде DMEM (1 г/л глюкозы) (Thermofisher, USA) с добавлением 20% заменителя сыворотки HyClone (США), антибиотика пенициллина и антимикотика стрептомицина (оба – Gibco, США). Клетки высевали в культуральные флаконы (TPP, Швейцария) в количестве $1 - 4 \cdot 10^5$ кл/см² и культивировали при 37°C, 5% CO₂ и 80% влажности в условиях гипоксии (7% O₂). Смену среды производили каждые 3 суток.

Проточная цитометрия

Анализ экспрессии поверхностных антигенов проводили с использованием следующих моноклональных антител: CD44-FITC/CD73-PE/CD9-PC5/CD105-PC7 и CD34-FITC/CD117-PE/CD14-PC5/CD45-PC7 (все Beckman Coulter, США). Анализ проводили с помощью проточного цитометра Navios (Beckman Coulter, США), используя полупроводниковые диодные лазеры с длиной

волны 488 и 638 нм, в соответствии с инструкциями производителя. Для определения жизнеспособности клетки окрашивали раствором 7AAD, не проникающего внутрь живых клеток, и подсчитывали процентное содержание неокрашенных клеток. Гейтирование графиков флуоресценции осуществляли по популяции живых клеток, не окрашенных раствором 7AAD, выделяя их по параметрам прямого и бокового светорассеяния.

Мечение клеток. Магнитная сепарация.

Измерение скорости пролиферации

В работе использовались непокрытые наночастицы оксида железа (IONP, iron oxide nanoparticles), соответствующие ТУ 1791-003-36280340-2008 («Передовые порошковые технологии», Россия) и представляющие собой смесь частиц с суперпарамагнитными (SPION, superparamagnetic iron oxide nanoparticles) и ферромагнитными свойствами. В предыдущем исследовании мы показали, что размер данных частиц 14–130 нм, однако в клетках они часто образуют агрегаты размером до 2 мкм. Подготовка IONP производилась согласно описанному ранее протоколу [1]. Мечение клеток осуществляли с помощью предварительно обработанных ультразвуком частиц, которые добавляли в культуральную среду в концентрации 300 мкг/мл и инкубировали в течение 8 часов. Далее среду удаляли, снимали клетки с подложки, а меченые клетки отделяли методом магнитной сепарации с помощью магнитного миништатива (Силекс, Россия) и вносили в лунки 6-луночных планшетов в количестве 104 клеток на лунку. Кривую роста строили по стандартной методике, подсчитывая клетки в камере Горяева на 1, 2, 3 и 5 день после посева.

Способ введения клеточных структур и их визуализации

Клетки метили, как описано выше, при концентрации частиц 300 мкг/мл. Для первичной оценки 5x10⁶ клеток ресуспендировали в 5 мл физиологического раствора и помещали в шприцы объемом 5 мл. Имеющиеся клеточные структуры были введены в артериальное русло печени путем эндоваскулярной хирургии. Через сутки после введения клеток пациенту была выполнена МРТ органов брюшной полости и грудной клетки. Сканирование проводили на магнитно-резонансных томографах Siemens Espree и PHILIPS Ingenia с напряженностью магнитного поля 1,5 Тл.

Локализация IONP в биоптатах печени после проведения терапии

Биоптаты ткани печени получали через 6 и 12 месяцев после проведения клеточной терапии. Биопсия была выполнена при помощи лапароскопии. Биопсии подвергались участки, в которых были визуализированы введенные клеточные структуры при помощи МРТ.

Для иммуногистохимического окрашивания биоптаты, полученные через 6 месяцев, заливали в парафиновые блоки и приготавливали срезы по стандартным протоколам клинично-лабораторной диагностики. Часть срезов дополнительно окрашивали с помощью качественной реакции на ионы железа (см. ниже). Локализацию ионов железа и классификацию клеток осуществляли при исследовании клеток с помощью микроскопа Zeiss Paskal.

Биоптаты, полученные через год тем же образом, использовали для получения первичных культур МСК и оценки содержания в них ионов Fe³⁺. Биоптаты ферментировали в 0,1% растворе коллагеназы I и IV типов (Sigma, США) в течение 50 минут при 37°C. Полученную клеточную смесь затем центрифугировали (400 g, 10 минут) и ресуспендировали в культуральной среде DMEM (1г/л глюкозы) (ThermoFisher, USA) с добавлением 20% заменителя сыворотки HyClone (США), антибиотика пенициллина и антимикотика стрептомицина (оба – Gibco, США). Клетки высевали в культуральные флаконы (TPP, Швейцария) в количестве 1 – 4 • 10⁵ кл/см² и культивировали при 37°C, 5% CO₂ и 80% влажности в условиях гипоксии (7% O₂) в течение 24 часов. Далее клетки окрашивали реагентами для выявления ионов железа (III).

Верификация интернализации IONP с помощью гексацианоферрата калия K₄[Fe(CN)₆]

Для выявления в клетках ионов железа (III) образцы клеточных культур и гистологические срезы обрабатывали гексацианоферратом калия K₄[Fe(CN)₆] по стандартной методике [4]. Клетки отмывали от среды, фиксировали 4% параформальдегидом в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) в течение 20 минут при комнатной температуре. Затем вновь промывали в ФСБ и окрашивали смесью (1:1) 10% гексацианоферрата калия K₄[Fe(CN)₆] и 20% HCl 40 минут.

При наличии в препарате клеток Fe³⁺ происходит образование комплексного соединения – берлинской лазури, KFe[Fe(CN)₆], соединения насыщенного синего цвета. После окрашивания препараты отмывали дистиллированной водой и анализировали с помощью инвертированного микроскопа EVOS (ThermoFisher, США). При исследовании гистологических срезов биоптата печени окраске предшествовала депарафинизация с помощью ксилола. После окраски и отмывки стекла окрашивали красителем 0.1% Nuclear Fast Red (Sigma-Merck-Millipore) в течение 1 минуты, ополаскивали водой и заключали в заключочную среду HistoMount (Thermo Fisher).

Лабораторные и инструментальные методы диагностики

Перед началом лечения и через 6 месяцев после проведения терапии пациенту были выполнены контрольные клинический и биохимический анализы крови, эластография и MEGX тест. Для субъективной оценки состояния пациента выполнялся тест субъективной комфортности (А.Б. Леонова).

Все описанные исследования проводились в СЗГМУ им. И.И. Мечникова на основании положения о работе НИЛ клеточных технологий и договора с ООО «Покровский банк стволовых клеток» и протокола №4 этического комитета от 27.05.20 г.

Статистическая обработка данных

Для каждого образца эксперимент повторяли не менее трех раз. Для оценки значимости различий ($p < 0,05$) при анализе пролиферативной активности использовали множественный t-test. Анализ полученных данных и построение графиков проводили в программе GraphPad Prism 7. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение.



Рисунок 1. Целиография и мезентерикография пациента А. Стрелкой обозначена правая печеночная артерия, в которую вводились аутологичные мезенхимальные стволовые клетки.
Figure 1. Coeliography and mesentericography data of patient A. The arrow indicates the right hepatic artery where autologous mesenchymal stem cells were implanted.



Рисунок 2. Магнитно-резонансная томография органов брюшной полости на 1 сутки после введения аутологичных мезенхимальных стволовых клеток в артериальное русло печени. Стрелкой указаны области печени, в которых визуализируются маркированные стволовые клетки.
Figure 2. Magnetic resonance imaging of abdominal organs on 1 day after the insertion of autologous mesenchymal stem cells into the arterial bed of the liver. The arrow indicates the areas of the liver where the marked stem cells are visualized.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Пациент А., 55 лет, госпитализирован в хирургическое отделение клиники университета с диагнозом цирроз печени алиментарной этиологии класс А по Чайлд-Пью. Осложнениями основного заболевания у пациента явились: портальная гипертензия с варикозным расширением вен пищевода 1 ст., спленомегалия и гиперспленизм.

Для лечения данного пациента использовались клеточные технологии в виде введения в артериальное русло печени аутологичных мезенхимальных стволовых клеток в количестве 25×10^6 . Пациенту в условиях стационара было выполнено введение аутологичных мезенхимальных стволовых клеток в артериальное русло печени (рисунок 1).

	До начала терапии	Через 6 месяцев после проведения терапии
Тромбоциты ($10^9/\text{л}$)	90,6	129,8
Эритроциты ($10^{12}/\text{л}$)	3,5	4,8
Лейкоциты ($10^9/\text{л}$)	3,3	6,9
Билирубин (мкмоль/л)	23,2	18,6
Альбумин (г/л)	32,4	49,5
АЛТ (Е/л)	65,2	20,7
АСТ (Е/л)	54,2	24,2
ЩФ (Е/л)	239,3	98,5
ГГТП (Е/л)	123,8	35,7
Тест субъективной оценки	сниженный уровень субъективного комфорта, пониженное самочувствие	высокий уровень субъективного комфорта, хорошее самочувствие
MEGX	значительное снижение функции печени	функция печени в нормальных пределах
Эластография	F4	F4–3

Таблица 1. Показатели лабораторных и инструментальных исследований до начала терапии и через 6 месяцев после проведения лечения
Table 1. Indicators of laboratory and instrumental examinations before the start of therapy and 6 months after the treatment

Перед введением культура аутологичных мезенхимальных стволовых клеток была обработана наночастицами оксида железа. Для введения использовали полученные методом магнитной сепарации клетки, содержащие наночастицы, что в последующем дало возможность визуализировать введенные стволовые клетки в организме пациента при выполнении магнитно-резонансной томографии органов брюшной полости (рисунок 2). Через сутки после проведения клеточной терапии пациенту была выполнена МРТ органов брюшной полости и грудной клетки.

На представленном снимке МРТ органов брюшной полости введенные стволовые клетки визуализируются в правой доле печени. При этом в каких-либо других органах брюшной полости, а также в грудной клетке клеточные структуры не выявлены.

Все выполненные процедуры пациент перенес удовлетворительно, каких-либо осложнений отмечено не было. В удовлетворительном состоянии пациент был выписан на амбулаторное наблюдение. Одним из условий участия пациента в лечении с использованием клеточных технологий был полный отказ от употребления алкоголя как до, так и после проведения терапии. Также в течение 6 месяцев после применения клеточных технологий пациент не использовал каких-либо гепатотропных препаратов. Через 6 месяцев после проведения лечения пациенту выполнялись контрольные исследования. Данные проведенных исследований до начала лечения и через 6 месяцев после проведения терапии ($p < 0,05$) представлены в таблице 1.

Как видно из представленных в таблице 1 данных, у пациента отмечается достаточно значимая положительная динамика — как в

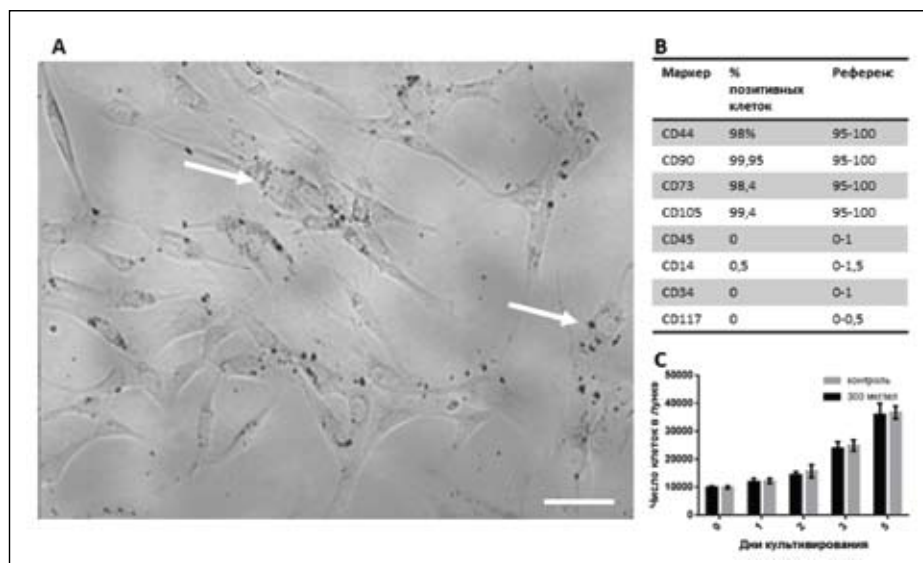


Рисунок 3. Анализ морфофункциональных свойств клеток, содержащих IONP. (А) Общий вид культуры МСК после обработки IONP, 300 мкг/мл. Масштабный отрезок – 50 мкм. Стрелками отмечены некоторые из IONPs. (В) Результат иммунофенотипирования культур МСК после обработки IONP. (С) Диаграмма пролиферативной активности МСК, необработанных IONP (контроль) и обработанных IONP, 300 мкг/мл. Представлены результаты подсчета числа клеток в лунке (ось Y) в зависимости от дня культивирования (ось X). Данные представлены в виде среднего и ошибки среднего.

Figure 3. Analysis of morphofunctional properties of cells containing IONP. (A) General view of MSC culture after IONP labeling, 300 mcg / ml. The scale segment is 50 microns. Arrows mark some of the IONPs. (B) The result of immunophenotyping of MSC cultures after IONP labeling. (C) The diagram of proliferative activity of MSC, unmarked with IONP (control) and marked with IONP, 300 mcg/ml. The results of counting the number of cells in the well (Y-axis) depending on the day of cultivation (X-axis) are presented. The data is presented as an average and an error of the average.

улучшении функции печени, так и в улучшении оценки субъективного состояния самочувствия. По данным эластографии печени, отмечалось лишь незначительное улучшение состояния паренхимы печени с сохранением проявлений цирроза печени. Через 6 месяцев после проведения терапии пациенту была выполнена биопсия печени из области печеночной ткани, в которой были визуализированы введенные клеточные структуры.

Оценка иммунофенотипа и жизнеспособности меченых МСК

После инкубации с IONP и последующей магнитной сепарацией в более чем 90% клеток культур были выявлены наночастицы при анализе методами световой микроскопии (**рисунок 3А**). Световая микроскопия позволяет выявить агрегаты частиц размером более 0,5 мкм. Способность частиц агрегировать в клетках была продемонстрирована нами ранее. Мы не исключаем, что остальные клетки также содержали IONP малых размеров, недостаточных для визуализации при световой микроскопии.

Согласно принятому определению мезенхимальных стволовых клеток, которое было предложено Международным обществом клеточной терапии, на мембране этого типа клеток выявляется определенный набор поверхностных лигандов [5], которые можно выявить с помощью проточной цитометрии после обработки клеток соответствующими антителами. Используемые в работе антитела указаны в разделе

«Материалы и методы». При исследовании характера экспрессии поверхностных антигенов у мезенхимальных стволовых клеток после добавления IONP, 300 мкг/мл (**рисунок 3В**) достоверные различия в сравнении с референтными значениями не выявлялись.

По своей пролиферативной активности клетки с IONP соответствовали контрольным, не содержащим наночастиц (**рисунок 3С**).

Таким образом, включение наночастиц оксида железа не оказывало влияния на базовые характеристики мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани.

Локализация наночастиц до (в культурах МСК жировой ткани) и после (в гистологических срезах биоптата печени и культурах МСК биоптата) трансплантации

Для подтверждения того, что наблюдаемые включения являются именно наночастицами оксида железа (III), использовали окрашивание гексацианоферратом железа.

Одним из преимуществ данного метода является возможность визуализировать присутствие в клетке IONP с размером менее 0,5 мкм. Частицы такого размера недоступны для наблюдения в световой микроскоп. Однако содержащие их клетки окрашиваются в яркий синий цвет.

Мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани в норме не содержат значимого количества Fe^{3+} и не окрашиваются данным реагентом. Обработанные IONP клетки содержали значительное количество интернализированных частиц оксида железа (III), окрашиваемых гексацианоферратом железа в синий цвет (**рисунок 4А**). При этом окраска наблюдалась только в цитоплазме, но не в ядре.

В гистологических препаратах биоптатов печени, полученных из области трансплантации меченых МСК, наибольшее количество окрашенных клеток наблюдали в микроузлах печени, а также на границах микроузлов и фиброзных септ (**рисунок 4В**). В нормальных тканях печени железо (III) или отсутствует, или выявляется в небольших количествах. Содержание в гепатоцитах повышается при накоплении гемосидерина и развитии гемосидероза печени, что характерно для пациентов с циррозом печени алкогольной этиологии. Однако у данных пациентов гемосидероз диагностирован не был. Наличие окраски в гепатоцитах микроузлов позволяет предположить, что по крайней мере часть трансплантированных клеток, возможно, дифференцируется в гепатоцитарном направлении. Мезенхимальные стволовые

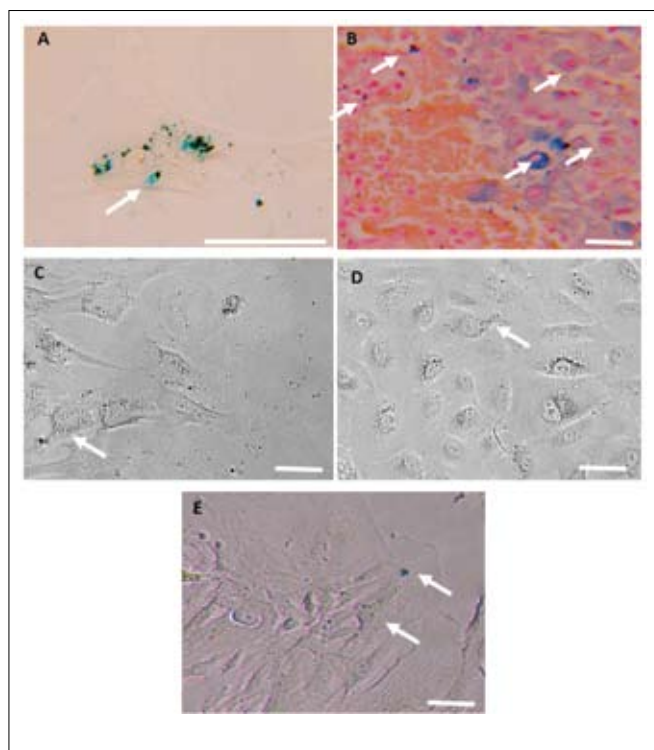


Рисунок 4. Исследование локализации IONP в клетках методом микроскопии препаратов, окрашенных гексацианоферратом железа (A, B, E) и неокрашенных (C, D): (A) в МСК после обработки IONP, 300 мкг/мл перед трансплантацией; (B) в клетках гистологического препарата печени, полученного через 6 месяцев после трансплантации; (C–D) в первичных культурах клеток биоптата до первого пересева (C – фибробластоподобная колония, D – эпителиоподобная колония) и после 2 пересевов (E). Масштабный отрезок – 50 мкм. Стрелками отмечены некоторые из IONP.

Figure 4. Investigation of IONP localization in cells by microscopy of preparations stained with iron hexacyanoferrate (A, B, E) and unstained (C, D): (A) in MSC after IONP labeling, 300 mcg/ml before transplantation; (B) in cells of histological preparation of liver bioptate obtained 6 months after transplantation; (C–D) in primary cultures of bioptate's cells before the first re-seeding (C – fibroblast-like colony, D – epithelial-like colony) and after the second re-seeding (E). The scale segment is 50 microns. Arrows mark some of the IONPs.

клетки различного происхождения способны к такой трансдифференцировке, особенно при помещении их в условия, благоприятные для роста гепатоцитов или при локализации их в тканях печени [6, 7, 8]. Однако нельзя исключать и другие возможные причины попадания Fe^{3+} в гепатоциты.

Часть биоптата, полученного через 12 месяцев после трансплантации, использовали для получения первичных культур (рисунок 4C, E). До первого пересева культур в них выявляли колонии клеток как фибробластоподобной, так и эпителиальной морфологии. Оба типа колоний содержали частицы (рисунок 4C, D). Из-за малого количества материала окрашивания гексацианоферратом железа не проводили. Окрашивали клетки после 2–3 пересевов. В таких культурах клетки с эпителиальной морфологией уже не наблюдали, так как для их поддержания необходимы специальные среды.

Культуры клеток были однородны согласно данным иммунофенотипирования и состояли из мезенхимальных стволовых клеток. В этих клетках выявили IONP при окраске гексацианоферратом (рисунок 4E). Снижение

количества метки связано с делением клеток и распределением частиц между дочерними клетками.

■ ОБСУЖДЕНИЕ

Отсутствие лекарственных средств, которые способны влиять на формирование фиброзной ткани в печени, а также значимо улучшать функциональное состояние печеночной ткани, приводит к поиску альтернативных способов лечения. Это особенно важно для хирургической практики, когда оперативному вмешательству на печени подвергаются пациенты, страдающие циррозом. Возможность улучшить функцию печеночной ткани является одним из важных факторов успешного течения послеоперационного периода у данной категории больных. Но прежде чем говорить об эффективности применения клеточных технологий, важно было понять, где и в каких органах фиксируются вводимые клеточные структуры. Для отслеживания клеток в организме реципиента используемые методы не должны нарушать жизнеспособность клеток и влиять на их способность к делению [9]. Предлагаемые на сегодняшний день способы по визуализации вводимых клеточных структур включают в себя неоптические, оптические и гибридные методы [10, 11]. Однако большинство из них продемонстрировано лишь на уровне экспериментальных моделей [12].

Продemonстрированный нами клинический пример дал возможность визуализировать вводимые клеточные структуры в организме человека, что позволяет, во-первых, говорить об эффективности предложенного способа введения клеточных структур, а во-вторых, показывает эффективность использования клеточной терапии в виде улучшения показателей лабораторных и инструментальных методов исследования.

Подобные результаты позволяют проводить дальнейшие клинические работы в данном направлении, изучать стойкость полученного эффекта и необходимость проведения повторных процедур.

■ ВЫВОДЫ

1. Вводимые через печеночную артерию клеточные структуры фиксируются непосредственно в ткани печени, что позволяет считать эффективным данный способ доставки стволовых клеток непосредственно к ткани печени.

2. Применяемые в качестве меток клеточных структур предложенные наночастицы оксида железа не влияют на базовые характеристики аутологичных мезенхимальных стволовых клеток.

3. Клеточная терапия оказывает положительное воздействие на функцию печени, однако практически не влияет на фиброзные изменения печеночной ткани.

4. При выполнении биопсии печени после проведения клеточной терапии было выявлено, что часть трансплантированных клеток дифференцируется в гепатоцитарном направлении. ■

Конфликт интересов: все авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Erukashvili NI, Kotkas IE, Bogolyubov DS, et al. Detection of cells containing internalized multi-domain magnetic iron oxide (II, III) nanoparticles by MRI. *Zhurnal tekhnicheskoy fiziki*. 2020;90(9):1418–1427. (In Russ.). [Енукашвили Н.И., Коткас И.Е., Боголюбов Д.С. и др. Детекция клеток, содержащих интернализированные мультидоменные магнитные наночастицы оксида железа (II, III), методом МРТ. *Журнал технической физики*. 2020;90(9):1418–1427.
2. Belyakin SA, Bobrov AN. Mortality from cirrhosis of the liver as an indicator of the level of alcohol consumption in the population. *Vestnik Rossijskoj voenno-meditsinskoj akademii*. 2009;3:189–194. (In Russ.). [Белякин С.А., Бобров А.Н. Смертность от цирроза печени как индикатор уровня потребления алкоголя в популяции. *Вестник Российской военно-медицинской академии*. 2009;3:189–194].
3. Kaliaskarova KS, Bajmagambetova ZhB, et al. Modern aspects of pathogenesis of viral liver fibrosis. *The Journal of Clinical Medicine of Kazakhstan*. 2012;2(25):89–92. (In Russ.). [Калиаскарова К.С., Баймагамбетова Ж.Б. и др. Современные аспекты патогенеза вирусного фиброза печени. *Клиническая медицина Казахстана*. 2012;2(25):89–92].
4. Pogranc I, Dobrivojević Radmilović M, Ahmed L, et al. D-mannose-Coating of Maghemite Nanoparticles Improved Labeling of Neural Stem Cells and Allowed Their Visualization by ex vivo MRI after Transplantation in the Mouse Brain. *Cell Transplantation*. 2019;28(5):553–567. doi: 10.1177/0963689719834304
5. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315–317. doi: 10.1080/14653240600855905
6. Snykers S, De Kock J, Vanhaecke T, Rogiers V. Hepatic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells: In Vitro Strategies. *Mesenchymal Stem Cell Assays and Applications, Methods in Molecular Biology*. 2011;698:305–314. doi: 10.1007/978-1-60761-999-4_23
7. Stock P, Brückner S, Ebensing S, et al. The generation of hepatocytes from mesenchymal stem cells and engraftment into murine liver. *Nat Protoc*. 2010;5:617–627. doi.org/10.1038/nprot.2010.7
8. Kholodenko IV, Kurbatov LK, Kholodenko RV, et al. Mesenchymal Stem Cells in the Adult Human Liver: Hype or Hope? *Cells*. 2019;8(10):1127. doi: 10.3390/cells8101127
9. Frangioni JV, Hajar RJ. In vivo tracking of stem cells for clinical trials in cardiovascular disease. *Circulation*. 2004;110(21):3378–3383. doi.org/10.1161/01.cir.0000149840.46523.fc
10. Tong I, Zhao H, He Z, Li Z. Current perspectives on molecular imaging for tracking stem cell therapy. In: *Medical imaging in clinical practice. In Tech*. 2013;73–79. doi.org/10.5772/53028
11. Chen ZY, Wang Y-X, Yang F, et al. New researches and application progress of commonly used optical molecular imaging technology. *Biomed Res Int*. 2014;429198. doi.org/10.1155/2014/429198
12. Meleshina AV, Cherkasova EI, Shirmanova MV, et al. Modern methods of stem cell imaging in vivo (review). *Sovrem. tekhnol. med*. 2015;4. (In Russ.). [Мелешина А.В., Черкасова Е.И., Ширманова М.В. и др. Современные методы визуализации стволовых клеток in vivo (обзор). *Современные технологии медицины*. 2015;4]. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/sovremennyye-metody-vizualizatsii-stvolovykh-kletok-in-vivo-obzor>