

На правах рукописи

СЛАУТИН

Василий Николаевич

**ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ
МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ
КЛЕТОК И ФУКОКСАНТИНА ПРИ ФИБРОЗЕ ПЕЧЕНИ**

3.3.3. – Патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Екатеринбург – 2024

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель

доктор медицинских наук, доцент

Гребнев Дмитрий Юрьевич

Официальные оппоненты:

Гуляева Инна Леонидовна — доктор медицинских наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующая кафедрой патологической физиологии.

Власова Татьяна Ивановна — доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева», заведующая кафедрой нормальной и патологической физиологии.

Ведущая организация

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

Защита диссертации состоится «14» ____01____ 2025 г. в «10-00» часов на заседании совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук 21.2.074.03, созданного на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 620028, г. Екатеринбург, ул. Репина, д. 3.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке имени В.Н. Климова ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России по адресу: 620028 г. Екатеринбург, ул. Ключевская, д. 17, на сайте университета www.usma.ru, а также на сайте ВАК при Минобрнауки России: vak.minobrnauki.gov.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 20__ года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
д.м.н., профессор

**Базарный
Владимир Викторович**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Фиброз печени – это состояние, развивающееся в ответ на хроническое повреждение печени различной этиологии и характеризующееся качественными и количественными изменениями состава внеклеточного матрикса, а также нарушением его топографического распределения, приводящим к изменению долькового строения и нормальной архитектоники печени (Caligiuri и др., 2021; Kisseleva и др., 2021; Liu и др., 2022; Luangmonkong и др., 2023; Parola и др., 2024).

В настоящее время каждый 25-й человек в мире умирает вследствие заболевания печени, что составляет около 2 млн человек в год. По данным ВОЗ, заболевания печени занимают 11 место среди всех причин смерти, или около 4% от всех случаев летальных исходов (Devarbhavi и др., 2023). Из 2 миллионов ежегодных случаев смерти от заболеваний печени около половины наступает вследствие осложнений цирроза, терминальной стадии фиброза печени (Asrani и др., 2019). В последние годы показатель смертности от осложнений цирроза печени имеет четкую тенденцию к росту (Sepanlou и др., 2020). В России случаи смерти, связанные с патологией печени, занимают ведущее место в структуре гастроэнтерологической смертности (Bakulin и др., 2021). Несмотря на то, что в последние десятилетия достигнут прогресс в понимании патогенеза фиброза печени и выявлении новых терапевтических мишеней, в настоящее время не существует эффективного нехирургического метода лечения фиброза. Единственным методом остается трансплантация печени (Pei и др., 2023).

Степень разработанности темы исследования. В последние годы в качестве альтернативного хирургическому методу лечения фиброза печени была предложена терапия стволовыми клетками (Tan и др., 2021; Zhang и др., 2023; Zhang и др., 2022). Одним из основных типов стволовых клеток, применение которых для лечения патологии печени активно изучается, являются мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК). Пристальное внимание научного сообщества к ММСК обусловлено их низкой иммуногенностью, доступностью и относительной легкостью получения, высокой скоростью пролиферации и выраженным пролиферативным потенциалом (Lou и др., 2021). Применение ММСК для лечения патологии печени представляется

перспективным благодаря их иммуномодулирующему, противовоспалительному и антифибротическому действию, реализующемуся преимущественно за счет синтеза факторов роста, коллагенолитических ферментов и противовоспалительных цитокинов (Cardinale и др., 2023; Hu и др., 2023; Hua и др., 2023). В настоящее время при фиброзе печени применение ММСК, выделенных из костного мозга, жировой ткани, печени, пульпы зуба, пуповины и т. д., описано в большом количестве научных публикаций (Chen и др., 2017; Hao и др., 2017; Kao и др., 2020; Lee и др., 2020; Yamaza и др., 2015). Из них наиболее интересным представляется применение ММСК, выделенных из неонатальных источников, которые из-за низкой выраженности клеточного старения демонстрируют высокую пролиферативную активность, выраженный пролиферативный потенциал, заметные терапевтические свойства, повышенную способность к остеогенной дифференцировке и сниженную – к дифференцировке в адипоцитарном направлении при сравнении с ММСК, выделенными из тканей взрослого организма (Gao и др., 2023). Использование ММСК для лечения фиброза печени продемонстрировано в серии клинических исследований и проанализировано в нескольких ретроспективных мета-анализах данных клинических испытаний, демонстрирующих значимую эффективность ММСК и наличие минимальных побочных эффектов (Liu и др., 2022; Lu и др., 2023; Wang и др., 2023).

Несмотря на достигнутые успехи, внедрение ММСК в клиническую практику для лечения патологии печени сталкивается с фундаментальными ограничениями, снижающими их терапевтический потенциал (Didamoony и др., 2023; Fernández-Santos и др., 2022; Li и др., 2023; Yu и др., 2023). Существенным ограничением является их репликативное старение *in vitro*, сопровождающееся потерей основных функций из-за накапливающихся эффектов окислительного повреждения клеток свободными радикалами с нарушением репарации ДНК, изменениями в профиле экспрессии генов и эпигенетическими нарушениями (Srinivasan и др., 2022; Yang и др., 2021; Zhang и др., 2021b; Zupan и др., 2021). Другим ограничением внедрения ММСК в клиническую практику является то, что достигшие поврежденного органа клетки подвергаются действию провоспалительного, гипоксического, окислительного микроокружения с дефицитом питательных веществ, что приводит к их апоптозу и почти полному исчезновению (Tan и др., 2022; Amiri и др., 2014; Liao и др., 2022).

Благодаря разнообразным терапевтическим свойствам, относительной легкости и дешевизне получения природных фитохимических соединений активно изучается возможность их применения для лечения различных патологий, в том числе фиброза печени (Zhang и др., 2022). Среди прочего привлекает внимание каротиноид фукоксантин, выделяемый преимущественно из бурых и диатомовых водорослей. Фукоксантин – это пигмент подсемейства каротиноидов, который содержится в хлоропластах морских водорослей и играет ключевую роль в их фотосинтезе. Из-за уникального химического строения фукоксантин обладает ярко выраженными антиоксидантными и противовоспалительными свойствами (Li и др., 2022; Sayuti и др., 2023).

Активно изучается возможность применения фукоксантина для лечения широкого спектра патологий, включая нейродегенеративные и онкологические заболевания (Li и др., 2022; Мао и др., 2022; Wang и др., 2020). В ряде исследований продемонстрировано наличие гепатопротекторных свойств фукоксантина при воздействии активных форм кислорода, лекарственных средств, токсических веществ, в т. ч. алкоголя (Ammar Ben и др., 2023; Delgado-Ramallo и др., 2023; Wang и др., 2018; Zeng и др., 2018). Влияние на липидный обмен, наряду с антиоксидантными и противовоспалительными эффектами фукоксантина, делает его потенциальным препаратом выбора для лечения неалкогольной жировой болезни печени (Sayuti и др., 2023; Winarto и др., 2023). Антифибротическое действие фукоксантина при фиброзе легких было изучено *in vitro* и *in vivo* (Ma и др., 2017). В исследованиях, проведенных на культуре перисинусоидальных клеток печени Ито, установлена способность фукоксантина и его метаболитов ингибировать их активацию и дифференцировку в миофибробласты через канонический путь трансформирующего фактора роста- β (Kim и др., 2019; Li и др., 2021). Следовательно, необходимо определить наличие антифибротического действия фукоксантина *in vivo* при фиброзе печени и установить механизмы его реализации. Перспективным представляется комбинированное введение ММСК с фукоксантином с целью усиления антифибротического потенциала клеточной терапии.

Цель исследования — установить влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и фукоксантина на патогенез фиброза печени в эксперименте для разработки новых направлений патогенетической терапии.

Задачи исследования:

1. Идентифицировать соответствие выделенной из хориона плаценты первичной клеточной культуры требованиям Международного общества клеточной и генной терапии к ММСК и оценить их миграцию в печень в физиологических условиях и после моделирования фиброза.

2. Установить основные механизмы действия морского каротиноида фукоксантина при фиброзе печени и определить дозу для комбинированного введения с ММСК.

3. Определить основные механизмы действия ММСК после их аллогенной трансплантации на морфофункциональное состояние печени с фиброзными изменениями, вызванными введением тетрахлорметана.

4. Оценить структурно-функциональные изменения в печени при фиброзе после комбинированного введения фукоксантина и ММСК, выделенных из хориона плаценты, и сравнить ее эффективность с монотерапией фукоксантином или ММСК.

Научная новизна. В настоящем исследовании на модели тетрахлорметан (CCl₄)-индуцированного фиброза печени впервые применена аллогенная трансплантация ММСК, выделенных из хориона плаценты. При аллогенной трансплантации определена способность плацентарных ММСК к миграции в печень в физиологических условиях и после моделирования фиброза. Выявлено значительное увеличение количества ММСК, достигших печени при фиброзе.

Впервые установлены механизмы антифибротического действия ММСК, выделенных из хориона плаценты, на фоне фиброза печени. Выявленные механизмы реализуются через увеличение содержания фактора роста гепатоцитов (HGF), матриксных металлопротеиназ-9 и -13 (ММР-9; ММР-13) в печени. Также зафиксировано снижение лейкоцитарной инфильтрации печени и уровня провоспалительных цитокинов в сыворотке крови как результат иммуномодулирующего и противовоспалительного действия ММСК.

Впервые установлено, что каротиноид фукоксантин обладает антифибротическим действием при патологии печени. Введение фукоксантина приводило к регрессу фибротических изменений в печени за счет уменьшения содержания миофибробластов, снижения уровня трансформирующего фактора роста- β и уровней провоспалительных цитокинов и зависело от дозы.

В работе впервые предложено комбинированное введение ММСК и фукоксантина для терапии фиброза печени и определено значительное усиление фукоксантином антифибротического потенциала ММСК.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты исследования расширяют современные представления о влиянии и механизмах действия ММСК и каротиноида фукоксантина на фиброз печени. В работе представлены и с патогенетических позиций обоснованы данные об эффективности применения фукоксантина, ММСК и их комбинированного введения при фиброзе печени. Определены механизмы антифибротического действия фукоксантина на модели индуцированного CCl_4 фиброза печени, которые реализуются за счет уменьшения содержания миофибробластов, уровня трансформирующего фактора роста- β и уровней провоспалительных цитокинов. Установлены механизмы действия плацентарных ММСК при их аллогенной трансплантации на фоне фиброза печени, которые связаны с ММСК-опосредованным повышением содержания HGF и коллагенолитических ферментов в печени. При сравнении с монотерапией фукоксантином и ММСК наиболее выраженный регресс фиброзных изменений в печени определен при комбинированном введении фукоксантина и ММСК.

Результаты диссертационного исследования применяются в учебном процессе кафедр патологической физиологии и гистологии ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, а также внедрены в практику работы лаборатории энтеральных вирусных инфекций и лаборатории респираторных вирусных инфекций ФБУН ФНИИВИ «Виром» Роспотребнадзора.

Методология и методы исследования. Методология диссертационного исследования заключалась в формулировке научной гипотезы, определении цели и задач исследования, анализе научных источников, построении дизайна работы и проведении исследований для подтверждения выдвинутой гипотезы. Планирование экспериментов и выбор методов исследования проводились с учетом поставленной цели и задач исследования, а также в соответствии с современными стандартами лабораторных и экспериментальных исследований.

Для определения механизмов действия ММСК и фукоксантина и их влияния на фиброз печени было проведено моделирование фиброза тетрахлорметаном. С целью получения первичной культуры ММСК был отработан протокол выделения клеток из хориона плаценты и проведена идентификация полученной клеточной

культуры на соответствие критериям Международного общества клеточной и генной терапии (ISCT) с помощью иммунофенотипирования и проведения разнонаправленной дифференцировки. Факт дифференцировки определяли методами культурального исследования и проточной цитометрии. С помощью биохимического анализа была проведена оценка показателей сыворотки крови, характеризующих состояние печени. Методом иммуноферментного анализа проведено определение уровней провоспалительных цитокинов в сыворотке крови и факторов роста в гомогенате печени. Гистологическими и иммуногистохимическими методами определялась выраженность CCl_4 -индуцированного повреждения печени, содержание соединительной ткани, количество миофибробластов, уровень матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов, выраженность лейкоцитарной инфильтрации.

Положения, выносимые на защиту:

1. Выделенные из хориона плаценты мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки соответствуют критериям, установленным международным обществом клеточной и генной терапии к культуре ММСК, и обладают повышенной способностью к миграции в печень на фоне фиброза.

2. Введение фукоксантина приводит к регрессу структурно-функциональных изменений в печени при фиброзе за счет уменьшения содержания миофибробластов, снижения уровня трансформирующего фактора роста- β и уровней провоспалительных цитокинов. Установленное антифибротическое действие фукоксантина зависит от его дозы.

3. Механизмы антифибротического действия ММСК, выделенных из хориона плаценты, при их аллогенной трансплантации на фоне фиброза печени реализуются через увеличение содержания фактора роста гепатоцитов и матриксных металлопротеиназ-9 и -13.

4. Применение комбинированного введения ММСК и фукоксантина при фиброзе печени демонстрирует эффективность, значительно превосходящую показатели регресса фиброзных изменений при монотерапии фукоксантином или ММСК.

Степень достоверности и апробация результатов. Степень достоверности результатов исследования основана на применении методов, отвечающих требованиям современного уровня науки в соответствии с поставленной целью и

задачами научной работы, и на статистической обработке данных с использованием программы GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, США). Результаты работы были представлены и обсуждены на Международном конгрессе CRISPR-2023, г. Новосибирск, 2023; V Международной конференции «Наука будущего», г. Орел, 2023; IX Международном конгрессе по патологической физиологии, г. Белград, Сербия, 2023; III Конференции с международным участием «Врач – Пациент – Общество: иммунология, генетика и закон», г. Екатеринбург, 2023; VII Международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения», г. Екатеринбург, 2023; V Национальном конгрессе по регенеративной медицине, г. Москва, 2022; Всероссийской XV конференции патофизиологов Урала, г. Екатеринбург, 2022.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы. Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России (протокол № 11, 2021 г.). Исследование проведено на аутбредных ICR/CD1 мышах. Плацентарные ММСК получали от 8 самок возрастом 10-12 недель, весом 19-21 г., в 18-дневном сроке гестации. В основной части исследования использовали 90 самцов возрастом 14-15 недель, весом 20-25 г., распределенных по 9 группам, по 10 особей в каждой (Рисунок 1).

1 этап исследования был посвящен моделированию фиброза печени. Мыши интактной группы содержались в виварии в стандартных условиях, без манипуляций. Мыши опытной группы получали внутрибрюшинные инъекции 2 мкл/г CCl_4 , разведенного 1:9 в персиковом масле. Мышам контрольной группы вводили персиковое масло в эквивалентных CCl_4 дозах.

На 2 этапе исследования определяли механизмы действия и минимально эффективную дозу фукоксантина при фиброзе печени. В работе применяли фукоксантин (TargetMol, США) в дозах 5 мг/кг, 10 мг/кг, 30 мг/кг, разведенный в 150 мкл дистиллированной воды. В течение 5 недель после моделирования фиброза мыши группы сравнения содержались без манипуляций, а мышам групп фукоксантина вводили фукоксантин через желудочный зонд ежедневно в соответствующих дозах.

3 этап исследования был посвящен определению механизмов действия и эффективности ММСК и их комбинированного введения с фукоксантином при фиброзе печени. Мышам группы ММСК через 3 дня после последней инъекции CCl_4 проводили трансплантацию 1 млн клеток, ресуспендированных в PBS, в хвостовую вену. В группе комбинированного введения мышам вводили ММСК и ежедневно давали фукоксантин в дозе, определенной на II этапе.

Дополнительно были выделены 20 мышей для изучения миграции ММСК в печень (в физиологических условиях и после моделирования фиброза).

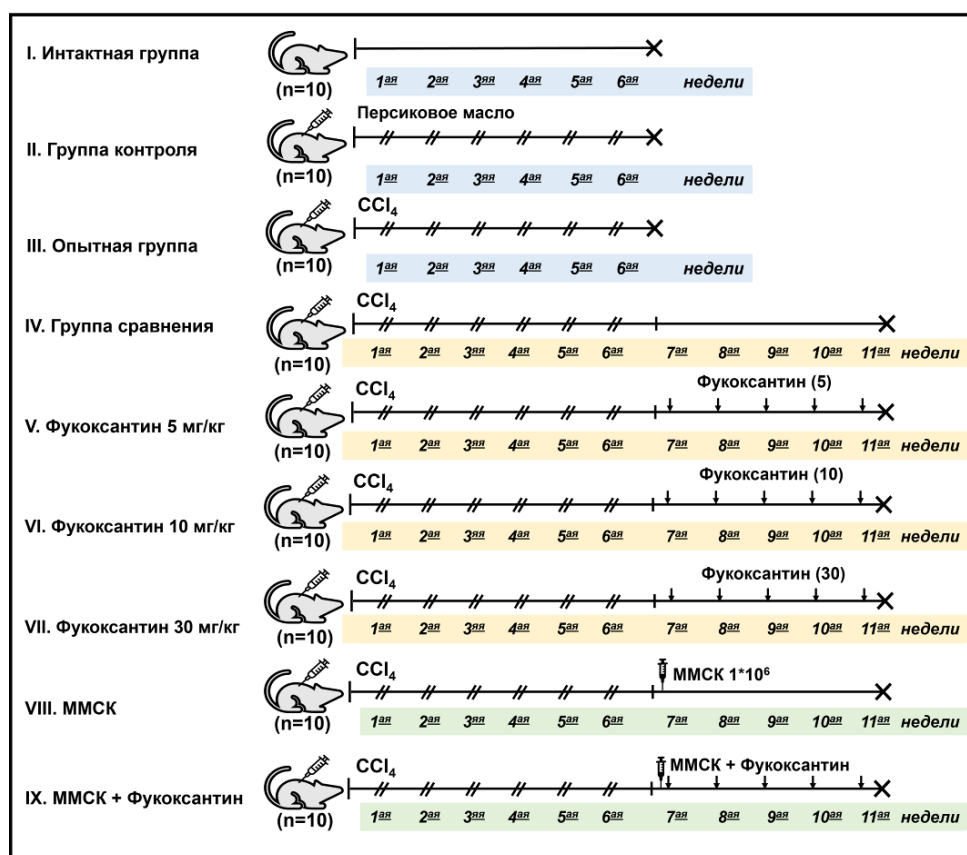


Рисунок 1 – Распределение мышей по группам (дизайн исследования)

Выделение, культивирование и идентификация плацентарных ММСК.

Выделение ММСК проводили в соответствии с методом А.С. Тепляшина (патент RU2252252, 2004 г.) с помощью ферментативной и механической диссоциации тканей плаценты с последующим выделением моноклеарной фракции клеток центрифугированием в градиенте плотности раствора лимфолайт-М (Cedarlane, Канада). В качестве среды для культивирования использовали MesenCult™ Expansion Kit Mouse (StemCell Technologies, Канада) с добавлением 2 ммоль L-глутамин (StemCell Technologies, Канада) и антибиотиков – 50 ед./мл пенициллина

и 50 мкг/мл стрептомицина (Sigma-Aldrich, США). Культивация клеток производилась в условиях CO₂-инкубатора (8000WJ3429, Thermo Scientific, США). Оценку жизнеспособности проводили с помощью красителя Trypan Blue (StemCell Technologies, Канада). Количество жизнеспособных клеток составило 95-97%. Иммунофенотипирование клеточной культуры проводили с помощью набора Mouse Mesenchymal Stem Cell Multi-Color Flow Cytometry Kit (R&D Systems, США) методом проточной цитометрии на проточном цитометре Beckman Coulter Navios (Beckman Coulter, США). Адипоцитарная и остеогенная дифференцировки производились с помощью набора Mouse Mesenchymal Stem Cell Functional Identification Kit (R&D Systems, США). Факт дифференцировки устанавливали методами культурального исследования и проточной цитометрии.

Для определения содержания ММСК, достигших печени, клетки метили с помощью CFDA-SE (Invitrogen, США). Через сутки после трансплантации ММСК мышей выводили из эксперимента методом цервикальной дислокации с последующим выделением печени. Определение количества в печени меченых ММСК проводили методом проточной цитометрии с расчетом общего количества меченых клеток на печень по формуле R. Henschler и соавторов (Henschler и др., 2004).

Таблица 1 – Лабораторные методы исследования

| | |
|------------------------------------|---|
| Гистологические исследования | Окраску микропрепаратов гематоксилин-эозином проводили с помощью набора N&E Staining Kit (Abcam, Великобритания). Для окраски на коллагены I и III типа применяли краситель Picro Sirius Red Stain Kit (Abcam, Великобритания). Для оценки выраженности фибротических изменений в печени использовали шкалу METAVIR. Определение площади окрашенной Sirius Red области проводили с помощью морфометрической программы SIAMS (ООО «Сиамс», Россия). В микропрепаратах оценивались 15 случайных областей площадью 0,28 мм ² (увеличение x 200). Распространенность соединительной ткани определялась как отношение окрашенной области к общей площади микропрепарата и выражалась в %. Анализ микропрепаратов проводили с помощью микроскопа Axio Scope.A1 и камеры AxioCam 208 color (Carl Zeiss, Германия). |
| Иммуногистохимические исследования | Для иммуногистохимического исследования применяли первичные антитела: моноклональное антитело Recombinant Anti-MMP9 antibody (Abcam, Великобритания), моноклональное антитело Recombinant Anti-MMP13 antibody (Abcam, Великобритания), поликлональное антитело Anti-TIMP1 antibody (Abcam, Великобритания), моноклональное антитело Recombinant Anti-alpha smooth muscle Actin antibody (Abcam, Великобритания). В качестве вторичного антитела использовали антитело, конъюгированное с HRP (Abcam, Великобритания). Окрашивание ядер проводили гематоксилином Майера (Abcam, Великобритания). Содержание лейкоцитов в печени определяли с помощью FITC-конъюгированного моноклонального антитела CD45R Antibody RA3-6B2 (Santa Cruz Biotech, США). Визуализацию ядер выполняли красителем DAPI (Abcam, Великобритания). На микроскопе AxioScope 5 (Carl Zeiss, Германия) проводили определение количества окрашенных клеток. Определение площади окрашенной на α-SMA, MMP-9, MMP-13, TIMP-1 области проводили как описано выше. |

Продолжение таблицы 1

| | |
|----------------------------|--|
| Иммуноферментный анализ | В сыворотке крови определяли уровни провоспалительных цитокинов – интерлейкина-1 β (Mouse IL-1 beta ELISA Kit, Abcam, Великобритания) и фактора некроза опухоли- α (Mouse TNF alpha ELISA Kit, Abcam, Великобритания). В гомогенате печени определяли уровни факторов роста – трансформирующего фактора роста- β (ELISA Kit for Transforming Growth Factor Beta 1, Cloud-Clone Corp, Китай), фактора роста гепатоцитов (Mouse HGF ELISA Kit, Abcam, Великобритания) с помощью анализатора Chem Well 2910 (Combi, США) |
| Биохимические исследования | В сыворотке крови оценивали активность аспартатамино-трансферазы (АСТ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ), измеряли уровни общего билирубина и альбумина с использованием наборов фирмы Spinreact, Испания, на анализаторе Chem Well 2910 (Combi, США). |

Статистический анализ. Для статистической обработки данных использовали программу GraphPad Prism 9.0. Нормальность распределения оценивалась w -критерием Шапиро–Уилкса. При нормальном характере распределения статистическую значимость межгрупповых различий определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим применением теста множественных сравнений Тьюки. При отсутствии нормальности распределения применяли тест Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация выделенных клеток и определение их способности к миграции в печень после моделирования фиброза. Согласно критериям ISCT ММСК обладают адгезивностью к пластику, экспрессируют определенные поверхностные маркеры и имеют потенциал к разнонаправленной дифференцировке. Способность к адгезии была подтверждена на этапе культивирования. Иммунофенотипированием определено наличие поверхностных маркеров (CD105; CD29; SCA-1) и отсутствие экспрессии панлейкоцитарного маркера CD45 (Рисунок 2). При адипоцитарной дифференцировке плацентарных ММСК выявлена часть клеток, содержащих жировые капли меньшего размера, что было подтверждено методом проточной цитометрии по наличию экспрессии белка, связывающего жирные кислоты-4 (FABP-4). Остеогенной дифференцировке подверглись все клетки в исследуемой культуре, что подтверждено наличием экспрессии остеопонтина (Рисунок 2). Резюмируя полученные результаты, можно

утверждать, что выделенная культура клеток является культурой ММСК и соответствует критериям ISCT.

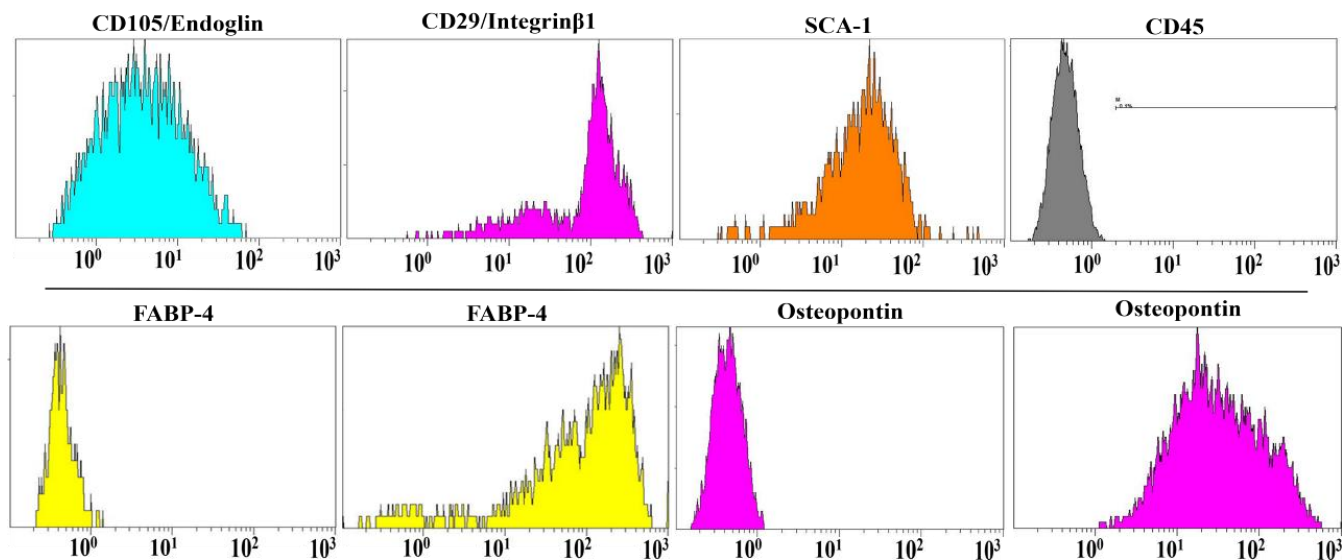


Рисунок 2 – Идентификация выделенной культуры ММСК в соответствии с международно-установленными критериями

Методом проточной цитометрии выявлено увеличение содержания меченых ММСК в печени в условиях фиброза на 269,5% относительно количества клеток, обнаруженных у интактных мышей. Усиление миграции ММСК в повреждённые ткани может быть обусловлено повышением выделения ими цитокинов (стромой вырабатываемый фактор-1, инсулиноподобный фактор роста-1 и др.), что аналогично миграции циркулирующих лейкоцитов в очаг воспаления (Юшков Б.Г., 2015; Yuan и др., 2022).

Морфофункциональные изменения в печени после моделирования фиброза. Вследствие хронического CCl_4 -индуцированного повреждения печени в опытной группе установлено повышение активности АЛТ и АСТ на 288,5% и 189,6%, уровня общего билирубина – в 4,5 раза и снижение уровня альбумина на 25,1%. В группе сравнения зафиксировано снижение данных показателей относительно опытной группы: АЛТ и АСТ – на 22,5% и 20,0%, общий билирубин – на 29,0%. В микропрепаратах печени опытной группы и группы сравнения, окрашенных гематоксилин-эозином, выявлено нарушение долькового строения с дисконплектацией печеночных пластинок, расширением портальных трактов, размытостью контура стромы портальных зон за счет воспалительной инфильтрации с диффузным выходом инфильтрата в паренхиму долек.

Согласно современной концепции патогенеза фиброза печени, его основным звеном является активация и дифференцировка клеток Ито в миофибробласты. В опытной группе установлено повышение в печени содержания миофибробластов в 29,6 раза и площади окрашенной на α -SMA области в 104 раза относительно интактной группы. В группе сравнения данные показатели были ниже на 31% и 28,3%. При фиброзе печени за синтез фибриллярных коллагенов ответственны миофибробласты. При анализе микропрепаратов, окрашенных Sirius Red, в опытной группе и группе сравнения локализацией коллагенов I и III типа являлись области портальных трактов и порто-портальных септ, а также области формирования порто-центральных септ (METAVIR, III стадия). При этом в 20% случаев в группе сравнения не выявлено порто-центральных септ (METAVIR, II стадия). В опытной группе определено увеличение площади окрашенной Sirius Red области в 5,3 раза. В группе сравнения зафиксировано снижение данных показателей на 74,8% и 39,5%.

Структурно-функциональные изменения в печени при фиброзе после введения фукоксантина. По биохимическим показателям сыворотки крови и изменению гистологической картины в микропрепаратах, окрашенных гематоксилин-эозином, не установлено достоверных различий между группой сравнения и группой фукоксантина 5 мг/кг. В группах фукоксантина 10 мг/кг и 30 мг/кг выявлено снижение активности АЛТ (на 21% и 24%), АСТ (на 23% и 20%) и уровня общего билирубина (на 21,5% и 25,9%) относительно группы сравнения. Показатель альбумина интактной группы и групп фукоксантина 10 мг/кг и 30 мг/кг не имел достоверных различий. При окраске гематоксилин-эозином гистологическая картина в микропрепаратах данных групп характеризуется однородностью паренхимы печени с выраженными синусоидами. Определяется воспалительный инфильтрат, местами выходящий за пределы портальных трактов (Рисунок 3).

Введение 5 мг/кг фукоксантина привело к уменьшению содержания миофибробластов на 14,0%; 10 мг/кг – на 29,1%; 30 мг/кг – на 35,8% относительно группы сравнения. Введение 10 мг/кг и 30 мг/кг фукоксантина снизило показатель площади окрашенной на α -SMA области на 52,8% и 54,4%. При анализе гистологической картины микропрепаратов печени, окрашенных Sirius Red, в группах фукоксантина 10 мг/кг и 30 мг/кг определено наличие единичных тонких

порто-центральных септ в 20% и 10% случаев соответственно (METAVIR, III стадия). Также зафиксировано снижение площади окрашенной Sirius Red области (на 22,6% и 26,1%) относительно группы сравнения.

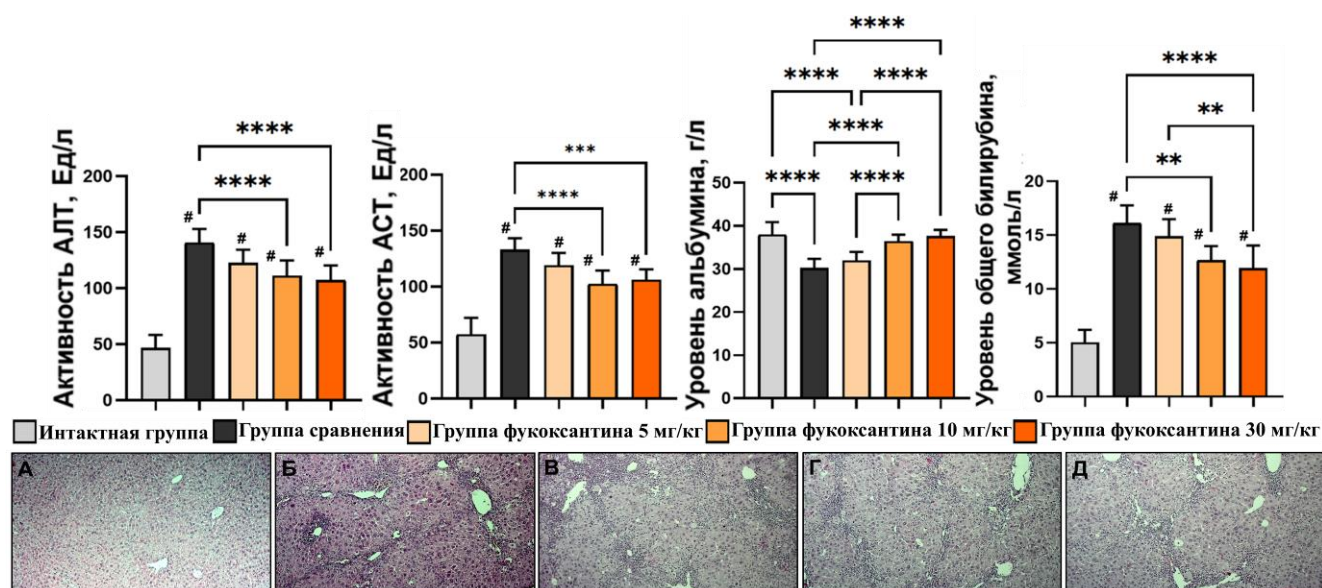


Рисунок 3 – Влияние фукоксантина на CCl_4 -индуцированное повреждение печени

Примечание: ****, # - $p < 0,0001$; ** - $p < 0,005$; * - $p < 0,05$; ns - $p > 0,05$; А – интактная группа; Б – группа сравнения; В – группа фукоксантина 5 мг/кг; Г – группа фукоксантина 10 мг/кг; Д – группа фукоксантина 30 мг/кг (увеличение $\times 100$).

Равновесие между матриксными металлопротеиназами и их ингибиторами способствует поддержанию физиологического состояния внеклеточного матрикса. Миофибробласты являются основным источником TIMP-1 при фиброзе печени. Выявленное снижение фукоксантином содержания миофибробластов способствовало уменьшению площади окрашенной на TIMP-1 области и количества окрашенных на TIMP-1 клеток в печени в зависимости от дозы (5 мг/кг – ns; 10 мг/кг – на 20,3% и 14,8%; 30 мг/кг – на 25,5% и 17,3%; рисунок 4).

Коллагенолитический фермент MMP-9 играет двойную роль при фиброзе печени в зависимости от стадии: на поздних стадиях MMP-9 участвует в деградации желатина, продукта распада фибриллярных коллагенов, и способствует апоптозу миофибробластов; на ранних стадиях синтезируемая макрофагами и миофибробластами MMP-9 участвует в разрушении базальной мембраны. Определено влияние фукоксантина на снижение площади окрашенной на MMP-9 области (10 мг/кг – 12,6%; 30 мг/кг – 17,7%) и количества окрашенных на MMP-9 клеток (5 мг/кг – 11,7%; 10 мг/кг – 14,9%; 30 мг/кг – 16,4%), что может представлять интерес с точки зрения терапии ранних стадий фиброза.

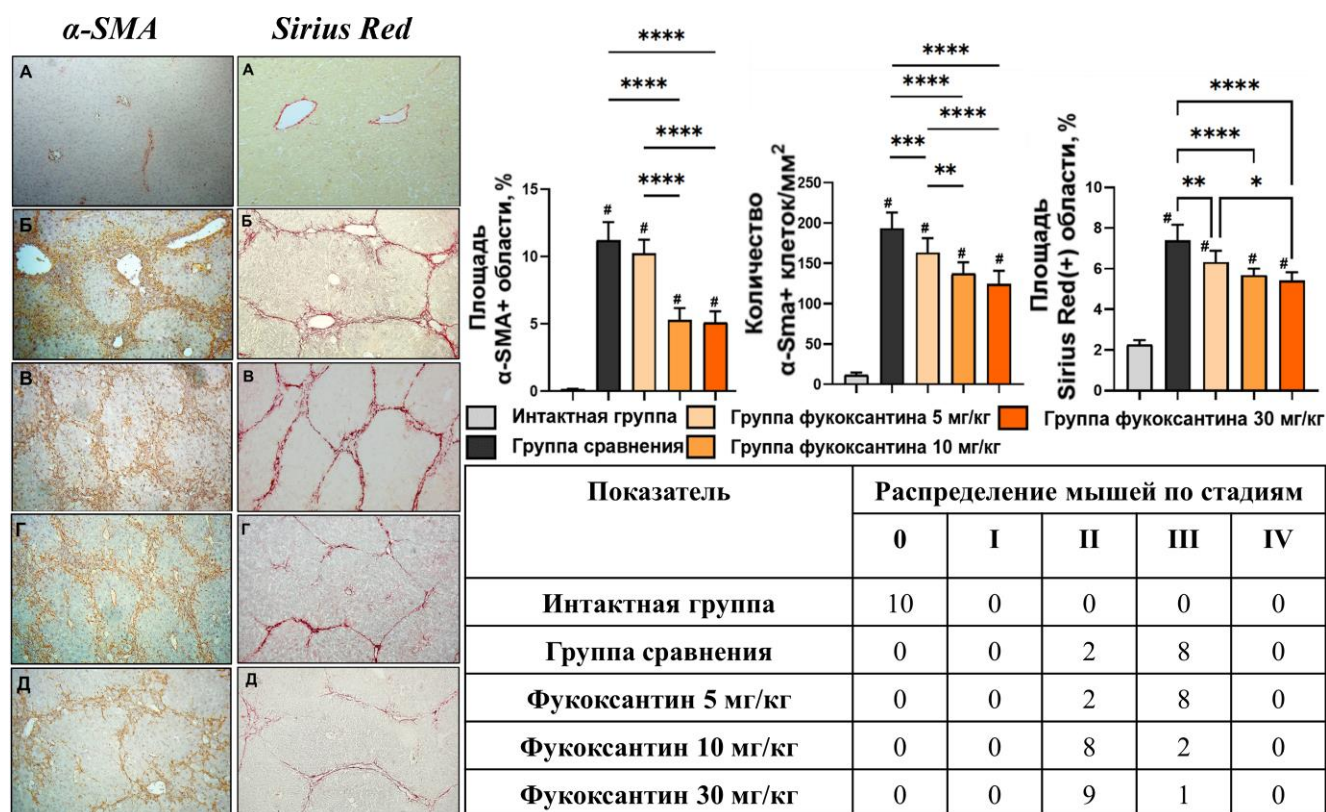


Рисунок 4 – Структурно-функциональные изменения в печени при введении фукоксантина на фоне фиброза

Примечание: А – интактная группа; Б – группа сравнения; В – группа фукоксантина 5 мг/кг; Г – группа фукоксантина 10 мг/кг; Д – группа фукоксантина 30 мг/кг (увеличение x 100). ****, # - $p < 0,0001$; *** - $p < 0,0005$; ** - $p < 0,005$; * - $p < 0,05$; ns - $p > 0,05$.

В патогенезе фиброза печени важную роль играют факторы роста TGF- β и его функциональный антагонист HGF. Установлено, что относительно интактной группы в группе сравнения уровень TGF- β повышен на 87,9%, а уровень HGF понижен на 58,7%. При фиброзе печени синтезируемый преимущественно миофибробластами TGF- β подавляет пролиферацию гепатоцитов, активирует клетки Ито и поддерживает их активированный фенотип. Уменьшение фукоксантином содержания миофибробластов в печени способствовало снижению уровня TGF- β (5 мг/кг – на 19,6%; 10 мг/кг – на 24,9%; 30 мг/кг – на 28,4%).

Напротив, HGF является антифибротическим фактором роста, усиливающим пролиферацию гепатоцитов, ингибирующим активацию клеток Ито и индуцирующим апоптоз миофибробластов. Введение фукоксантина привело к увеличению уровня HGF (5 мг/кг – ns; 10 мг/кг – на 28,7%; 30 мг/кг – на 42,2%).

При фиброзе печени M1-макрофаги являются важными источниками провоспалительных цитокинов, синтез которых может быть ингибирован фукоксантином (Jeong и др., 2023). Введение фукоксантина привело к снижению уровня IL-1 β (5 мг/кг – на 18,5%; 10 мг/кг – на 28%; 30 мг/кг – на 25,1%), уровня

TNF- α (5 мг/кг – на 10,7%; 10 мг/кг – на 21,6%; 30 мг/кг – на 32,8%), а также количества лейкоцитов (5 мг/кг – на 21,4%; 10 мг/кг – на 24,7%; 30 мг/кг – на 33,2%) относительно группы сравнения. На основании полученных данных можно заключить, что введение фукоксантина приводит к регрессу фибротических изменений в печени за счет уменьшения содержания миофибробластов, снижения уровня TGF- β и уровней провоспалительных цитокинов и зависит от дозы. Доза 10 мг/кг выбрана для комбинированного введения с ММСК.

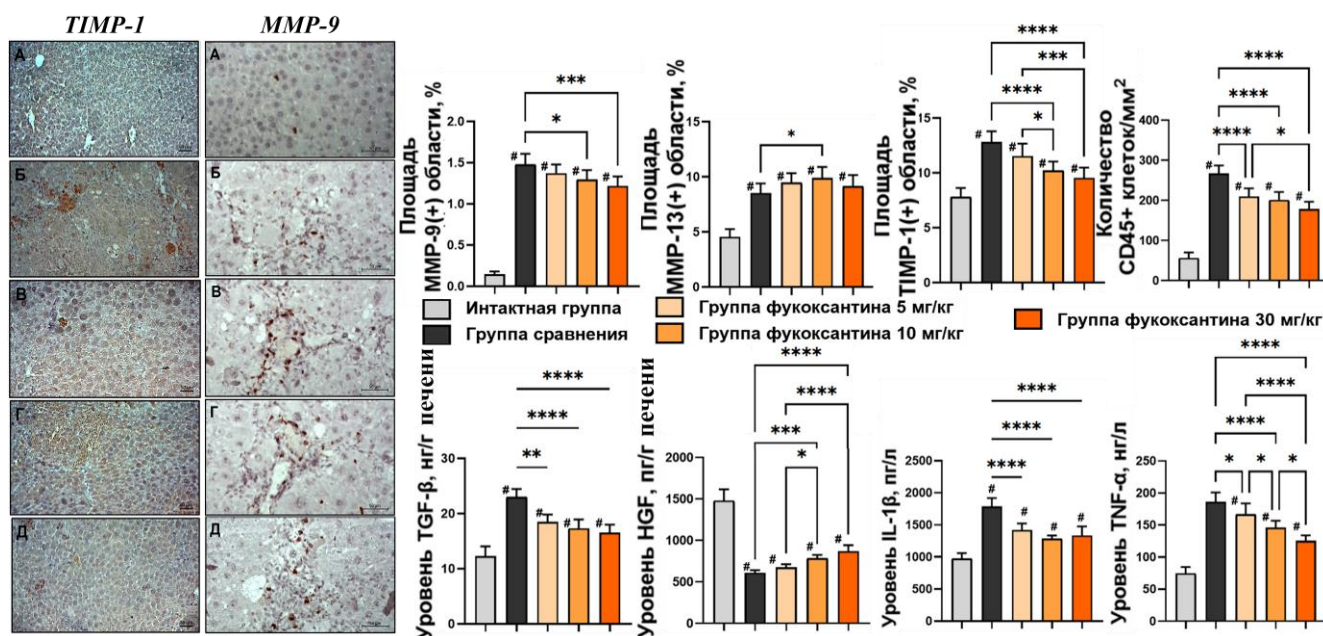


Рисунок 5 – Факторы роста, коллагенолитические ферменты и их ингибиторы, провоспалительные цитокины и лейкоциты при фиброзе печени

Примечание: А – интактная группа; Б – группа сравнения; В – группа фукоксантина 5 мг/кг; Г – группа фукоксантина 10 мг/кг; Д – группа фукоксантина 30 мг/кг (увеличение $\times 200$); ****, # - $p < 0,0001$; *** - $p < 0,0005$; ** - $p < 0,005$; * - $p < 0,05$; ns - $p > 0,05$.

Морфофункциональные изменения в печени при фиброзе после трансплантации ММСК и их комбинированного введения с фукоксантином. В группе ММСК и их комбинированного введения с фукоксантином установлено уменьшение активности АЛТ (на 24,5% и 46,5%), АСТ (на 23% и 41%) и снижение уровня общего билирубина (на 20,4% и 38,8%). Достоверных различий между интактной группой, группой ММСК и группой комбинированного введения по показателю альбумина не установлено.

При анализе окрашенных гематоксилин-эозином микропрепаратов печени группы ММСК гистологическая картина неоднородна. У большинства мышей воспалительный инфильтрат преимущественно локализуется в области портальных трактов, местами выходя за их пределы. В группе комбинированного

введения определяется умеренная воспалительная инфильтрация в области портальных трактов (Рисунок 6).

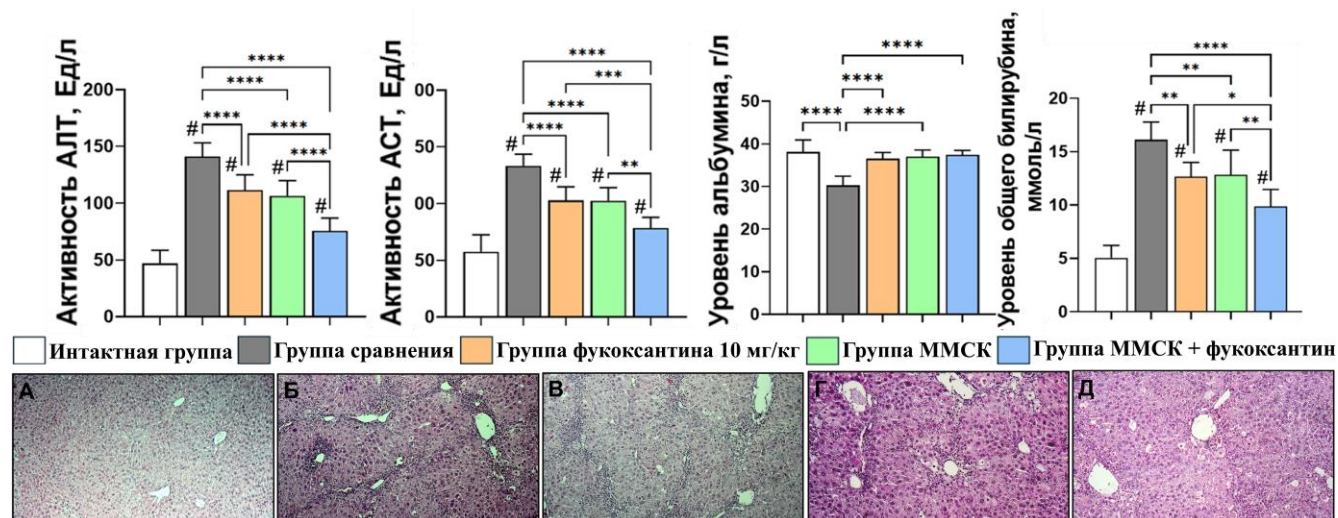


Рисунок 6 – Влияние трансплантации ММСК и их комбинированного введения с фукоксантином на выраженность СС1₄-индуцированного повреждения печени

Примечание: ****, # - $p < 0,0001$; ** - $p < 0,005$; * - $p < 0,05$; ns - $p > 0,05$; А – интактная группа; Б – группа сравнения; В – группа фукоксантина 10 мг/кг; Г – группа ММСК; Д – группа ММСК+фукоксантин (увеличение $\times 100$).

В группе ММСК и их комбинированного введения с фукоксантином установлено снижение содержания миофибробластов (на 25,1% и 54,2%) и площади окрашенной на α -SMA области (на 38,4% и 78,5%) относительно группы сравнения. Гистологические изменения в печени после трансплантации ММСК при фиброзе характеризовались наличием тонких порто-портальных септ в 80% случаев, из которых у половины определялись короткие формирующиеся порто-центральные септы (METAVIR, II-III стадии; Рисунок 7). У оставшихся 20% мышей определена I стадия фиброза печени по шкале METAVIR.

В группе комбинированного введения количество мышей с I стадией фиброза (METAVIR) выявлено в 50% случаев. В 20% случаев гистологическая картина характеризовалась множественными тонкими прерывистыми порто-портальными септами (METAVIR, II стадия). Ещё у 20% выявлено наличие тонких порто-центральных септ (METAVIR, III стадия). В оставшихся 10% случаев гистологическая картина соответствовала I стадии фиброза печени по шкале METAVIR. Также в группе ММСК и их комбинированного введения с фукоксантином определено снижение площади окрашенной Sirius Red области (на 33,2% и 50,5%) относительно группы сравнения (Рисунок 7).

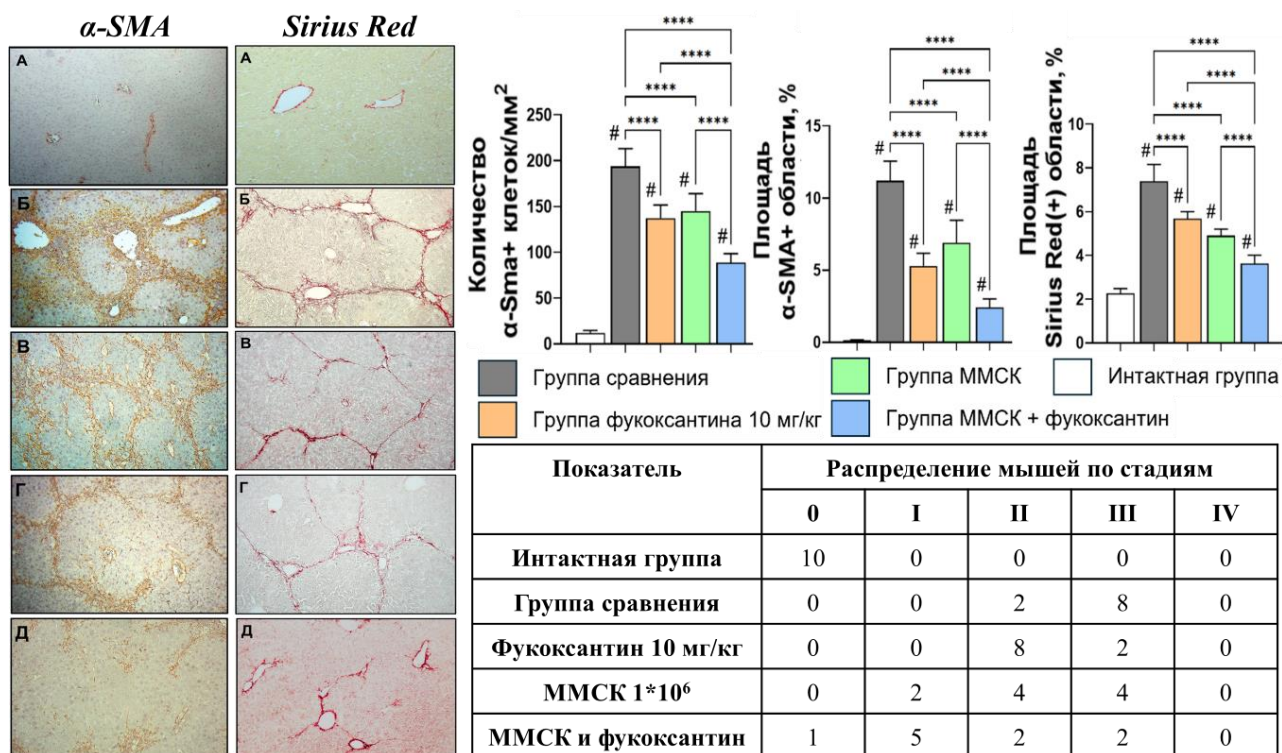


Рисунок 7 – Морфофункциональные изменения в печени после трансплантации ММСК и их комбинированного введения с фукоксантином на фоне фиброза

Примечание: А – интактная группа; Б – группа сравнения; В – группа фукоксантина 10 мг/кг; Г – группа ММСК; Д – группа ММСК+фукоксантин (увеличение x 100); ****, # - p < 0,0001.

Трансплантация ММСК и их комбинированное введение с фукоксантином привело к увеличению площади окрашенной на MMP-9 области (на 25,2% и 21,8%) и площади окрашенной на MMP-13 области (на 64,4% и 59,3%), снижению содержания окрашенных на MMP-9 клеток и увеличению количества окрашенных на MMP-13 клеток относительно группы сравнения. Достоверных различий по показателям MMP-9 и MMP-13 между данными группами не обнаружено. В группе ММСК выявлено снижение количества окрашенных на TIMP-1 клеток на 18,6% и площади окрашенной на TIMP-1 области на 25,8% относительно группы сравнения. Не установлено достоверных различий по данным показателям между интактной группой и группой комбинированного введения (Рисунок 8).

В группе ММСК и их комбинированного введения с фукоксантином установлено повышение уровня HGF (на 72,1% и 106,1%). В группе ММСК уровень TGF-β был ниже на 17,18% относительно группы сравнения, а в группе комбинированного введения ММСК и фукоксантина достоверных различий с интактной группой по уровню TGF-β не выявлено. Также в группе ММСК и их комбинированного с фукоксантином введения установлено уменьшение содержания лейкоцитов (на 21,9% и 47,7%) и уровня TNF-α (на 19,4% и 44,1%). При введении

ММСК уровень IL-1 β был ниже на 20,4% относительно группы сравнения, а при комбинированном введении ММСК и фукоксантина достоверных различий по показателю IL-1 β относительно интактной группы не выявлено (Рисунок 8).

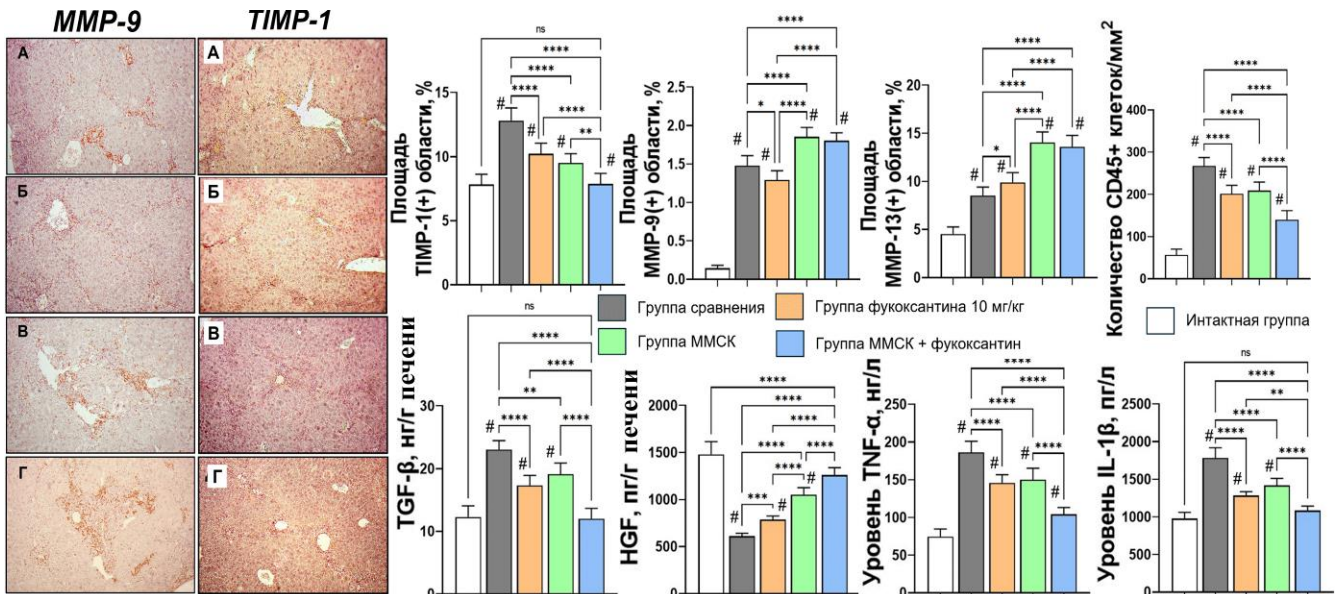


Рисунок 8 – Факторы роста, коллагенолитические ферменты и их ингибиторы, провоспалительные цитокины и лейкоциты при фиброзе печени

Примечание: А – группа сравнения; Б – группа фукоксантина 10 мг/кг; В – группа ММСК; Г – группа ММСК+фукоксантин (увеличение x 100); ****, # - $p < 0,0001$; *** - $p < 0,0005$; ** - $p < 0,005$; * - $p < 0,05$; ns - $p > 0,05$.

Таким образом, по результатам данного этапа работы установлено, что механизмы антифибротического действия ММСК реализуются через увеличение содержания фактора роста гепатоцитов и матриксных металлопротеиназ-9 и -13 в печени. Применение комбинированного введения ММСК и фукоксантина при фиброзе печени демонстрирует эффективность, значительно превосходящую показатели регресса фиброзных изменений при монотерапии ММСК или фукоксантином.

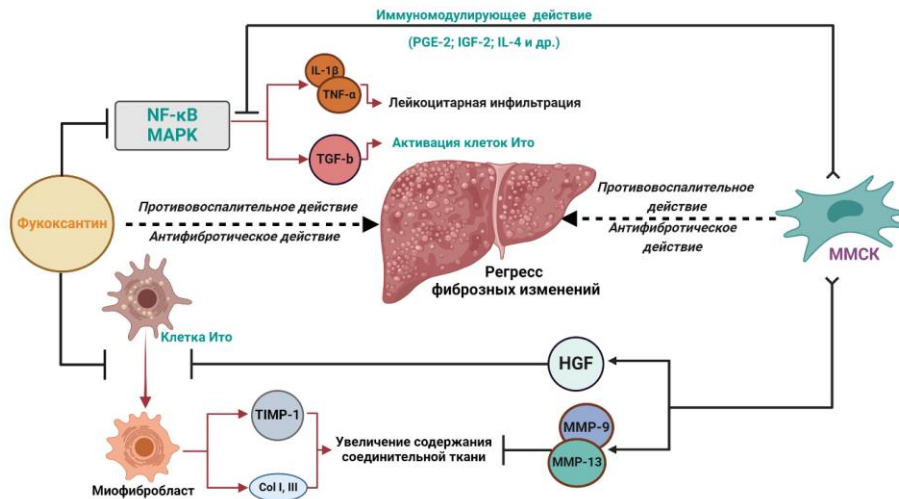


Рисунок 11 – Механизмы антифибротического действия ММСК и фукоксантина

Примечание: чёрным шрифтом обозначены собственные данные; зелёным шрифтом – данные обзора литературы.

ВЫВОДЫ

1. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, выделенные из хориона плаценты, соответствуют критериям международного общества клеточной и генной терапии, предъявляемым к ММСК, и обладают повышенной способностью к миграции в печень на фоне ее фибротических изменений, индуцированных тетрахлорметаном.

2. Введение фукоксантина после моделирования фиброза способствует регрессу морфофункциональных изменений в печени через уменьшение количества миофибробластов, снижения уровня трансформирующего фактора роста- β и уровней провоспалительных цитокинов.

3. Трансплантация мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из хориона плаценты, после моделирования фиброза печени приводит к снижению выраженности фибротических изменений за счет повышения уровня фактора роста гепатоцитов и увеличения содержания матриксных металлопротеиназ в печени.

4. Комбинированное введение ММСК и фукоксантина на фоне фиброза привело к восстановлению структурно-функциональных изменений в печени, а его эффективность при сравнении с монотерапией фукоксантином или ММСК была значительно выше.

УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

| | |
|----------------|--|
| ГЦК | – гепатоцеллюлярная карцинома |
| ММСК | – мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки |
| HGF | – фактор роста гепатоцитов |
| MMP-9 | – матриксная металлопротеиназа-9 |
| MMP-13 | – матриксная металлопротеиназа -13 |
| ISCT | – Международное общество клеточной и генной терапии |
| CFDA-SE | – 5(6)-карбоксифлуоресцеин диацетат сукцинимидиловый эфир |
| TIMP-1 | – тканевой ингибитор матриксных металлопротеиназ-1 |
| α -SMA | – α -гладкомышечный актин |
| HRP | – пероксидаза хрена |
| IL-1 β | – интерлейкин-1 β |
| TNF- α | – фактор некроза опухоли- α |
| TGF- β | – трансформирующий фактор роста- β |
| META VIR | – Meta-Analysis of Hisological Data in Viral Hepatitis |
| NF- κ B | – ядерный фактор каппа-усилитель легкой цепи активированных В-клеток |
| MAPK | – митоген-активируемая протеинкиназа |
| FABP-4 | – белок, связывающий жирные кислоты-4 |

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Fucoxanthin Enhances the Antifibrotic Potential of Placenta-derived Mesenchymal Stem Cells in a CCl₄-induced Mouse Model of Liver Fibrosis / V. Slautin, K. Konyshov, I. Gavrillov [et al.] // Current Stem Cell Research & Therapy. – 2024. – Vol. 19, Iss. 11. – P. 1484–1496. – <https://doi.org/10.2174/011574888x279940231206100902>.**
2. **Fucoxanthin exert dose-dependent antifibrotic and anti-inflammatory effects on CCl₄-induced liver fibrosis / V. N. Slautin, D. Yu. Grebnev, I. Yu. Maklakova, S. V. Sazonov // Journal of Natural Medicines. – 2023. – Vol. 77, Iss. 4. – P. 953–963. – <https://doi.org/10.1007/s11418-023-01723-9>.**
3. **Механизмы антифибротического действия плацентарных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток / Д. Ю. Гребнев, В. Н. Слаутин, И. Ю. Маклакова [и др.] // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2022. – Т. 19, № 4. – С. 355–364. – <https://doi.org/10.22138/2500-0918-2022-19-4-355-364>.**
4. **Антифибротическое действие фукоксантина на модели тетрахлорметан-индуцированного фиброза печени / В. Н. Слаутин, Д. Ю. Гребнев, И. Ю. Маклакова [и др.] // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2023. – Т. 67, № 2. – С.86–93. – <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2023.02.86-93>.**
5. **Влияние фукоксантина на основные механизмы развития CCl₄-индуцированного фиброза печени / В. Н. Слаутин, Д. Ю. Гребнев, И. Ю. Маклакова [и др.] // Фундаментальная и клиническая медицина. – 2023. – Т. 8, № 2. – С. 8–18. – <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2023-8-2-8-18>.**
6. **Применение фукоксантина для усиления терапевтического потенциала мезенхимальных стволовых клеток для лечения фиброза печени / В. Н. Слаутин, И. Ю. Маклакова, К. В. Кобышев [и др.] // Клиническая патофизиология : Материалы первого евразийского конгресса по патофизиологии. – 2024. – Т. 30, № 2. – С. 107.**
7. **Влияние трансплантации ММСК и фукоксантина на фиброз печени / В. Н. Слаутин, Д. Ю. Гребнев, И. Ю. Маклакова, К. Ю. Кобышев // Гены и клетки. – 2022. – Т. XVII, № 3. – С. 213–214.**
8. **Применение фукоксантина приводит к усилению антифибротического и противовоспалительного действия плацентарных ММСК при фиброзе печени / В. Н. Слаутин, Д. Ю. Гребнев, И. Ю. Маклакова // Гены и клетки. – 2023. – Т. XVIII. Приложение. – С. 213–214.**
9. **Противовоспалительное действие фукоксантина на модели CCl₄ индуцированного фиброза печени у мышей / В. Д. Боковой, В. Н. Слаутин, А. С. Бугаков, К. А. Гаврилова // Сб. ст. VIII Междунар. науч.-практич. конф. молодых ученых и студентов «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения». – Екатеринбург, 2023. – С. 1559–1565.**
10. **Слаутин, В. Н. Прекодиционирование фукоксантином плацентарных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток как эффективная**

стратегия решения проблем внедрения клеточных технологий в клиническую практику : сб. тезисов докл. участников V Междунар. науч. конф. «Наука будущего» и VIII Всерос. молодежн. науч. форума «Наука будущего – наука молодых». – Орел, 2023. – С. 120.

11. **Слаутин, В. Н.** Эффективность комбинированной терапии плацентарными ММСК и фукоксантином при фиброзе печени / **В. Н. Слаутин**, Д. М. Коновалова, Д. Ю. Гребнев // Сб. ст. VIII Междунар. науч.-практич. конф. молодых ученых и студентов «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения». – Екатеринбург, 2023. С. 1710–1716.

12. Cotreatment with placental MSCs in combination with fucoxanthin leads to regression of liver fibrosis in mice / **V. N. Slautin**, D. Y. Grebnev, I. Y. Maklakova, I. V. Gavrilov // Abstract book 9th international congress of pathophysiology 5th congress of pathophysiological sciences of Serbia with international participation. – 2023. – P. 167–168.

Патенты

1. Пат. 2802673 Российская Федерация. Способ лечения фиброза печени аллогенной трансплантацией мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) лабораторных животных : 2022128830 ; заявл. 07.11.2022 ; опубл. 30.08.2023 / Д. Ю. Гребнев, И. Ю. Маклакова, В.Н. Слаутин [и др.] ; заявитель ГАУЗ СО «ИМКТ»; ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России.

2. Пром. образец 140075 Российская Федерация. Схема Механизмы антифиброгенного действия аллогенных плацентарных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток при фиброзе печени : 2023502854 ; заявл. 13.06.2023 ; опубл. 16.01.2024 / Д. Ю. Гребнев, В. Н. Слаутин, И. Ю. Маклакова [и др.] ; заявитель ГАУЗ СО «ИМКТ»; ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России.

Слаутин Василий Николаевич

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ
МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК И
ФУКОКСАНТИНА ПРИ ФИБРОЗЕ ПЕЧЕНИ

3.3.3. Патологическая физиология

Автореферат диссертации на соискание
ученой степени кандидата медицинских наук

Автореферат напечатан по решению диссертационного совета
ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России _____ 2024 г.

Подписано в печать _____ 2024 г.

Формат 60 × 84 1/16. Усл. печ. л. 1,0. Тираж 100 экз.

Отпечатано в типографии ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России.