



Центральная экспериментальная лаборатория биотехнологий

Заведующий д.м.н., профессор,
заслуженный деятель науки Юшков Б.Г.

Юшков Б.Г., Данилова И.Г., Казакова И.А.

Роль стволовых клеток в регенерации печени и почек

Заболевания печени и почек, приводящие к их повреждению, широко распространены среди населения. Особую важность при этом приобретает вопрос о механизмах репаративной регенерации данных органов и возможных способах ее регуляции. Согласно современным представлениям, в восстановлении печени и почек после повреждения могут принимать участие не только их собственные, резидентные, стволовые клетки, но и стволовые клетки костномозгового происхождения [3, 5]. Закономерным является вопрос о механизмах, контролирующих миграцию стволовых клеток из костного мозга к поврежденному органу. Ключевыми факторами, обеспечивающими рекрутинг стволовых клеток, являются SDF-1, HGF и SCF [1, 2]. Обращает на себя внимание тот факт, что данные цитокины синтезируются или же активируются макрофагами [4, 6]. Таким образом, влияние макрофагов на восстановительные процессы в печени и почках может быть связано с действием фагоцитирующих мононуклеаров и на стволовые клетки костномозгового происхождения.

Цель работы

Оценить содержание костномозговых стволовых клеток в костном мозге, периферической крови, печени/почках при частичной гепатэктомии/нефрэктомии.

Материалы и методы

Исследования были проведены на 30 беспородных мышях-самцах. Для моделирования повреждения печени животным проводилась частичная гепатэктомия по Хиггинсу и Андерсону, для моделирования повреждения почек – частичная левосторонняя нефрэктомия (удалялась треть левой почки). Кроме того, была сформирована интактная группа мышей. Через 1 сутки животных всех трех исследуемых групп выводили из эксперимен-

та передозировкой эфира и забирали костный мозг, кровь и печень/почку (оперированную и контрлатеральную).

Оценку содержания стволовых клеток в тканях осуществляли стандартным методом прямого иммунофлюоресцентного окрашивания с использованием моноклональных антител производства BD Biosciences анти CD117-PE, IgG2b и соответствующего «изотипического» контроля (крысиные IgG2b-PE; BD). Печень и почки предварительно дезагрегировали при помощи специального прибора BD Medimachine и фильтров с размером пор 50–70 мкм. Лизис эритроцитов осуществляли с помощью коммерческого лизирующего буфера FACS Lysing Solution фирмы BD Biosciences. Для контроля границ лейкоцитарного гейта применяли моноклональные антитела против общелейкоцитарного антигена CD45 (анти CD45-PerCP-Cy5.5, IgG2b; изотипический контроль – крысиный IgG2b-PerCP-Cy5.5; BD). Цитофлюориметрию осуществляли на проточном цитофлюориметре FC500 (Beckman Coulter), при этом регистрировали суммарно не менее 100000 событий.

В качестве стволовых клеток рассматривались клетки, имевшие морфологию малого лимфоцита (по параметрам переднеуглового и малоуглового светорассеяния), слабо экспрессировавшие маркер CD45 и являющиеся CD117+. Доля стволовых клеток высчитывалась от общего количества CD45-позитивных клеток.

Определение абсолютного количества стволовых клеток в костном мозге и крови проводилось с использованием двухплатформенного метода. Для подсчета абсолютного количества стволовых клеток в крови использовались данные о количестве лейкоцитов, полученные на гематологическом анализаторе Celly70 Biocode-Hucel. Принималось, что количество лейкоцитов, определенное гематологическим анализатором, соответствует количеству CD45+ клеток, выделенных нами в гейт А.

Для подсчета абсолютного количества миелокариоцитов мы использовали камеру Горяева. Кроме того, проводили подсчет миелограммы, так как в случае с костным мозгом не все миелокариоциты экспрессируют CD45, а следовательно, их необходимо исключить из рассмотрения.

Для определения абсолютного количества клеток в печени/почках использовался одноплатформенный метод – применялись пробирки TruCount Tubes (BD).

Оценивалось количество макрофагов в печени и почках интактных и оперированных животных методом иммуногистохимического окрашивания с использованием непрямого пероксидазного метода (применялись анти-CD172a антитела).

Статистический анализ данных проводили с помощью программы

StatSoft Statistica 6.0. Для проверки гипотезы об однородности двух независимых выборок использовался непараметрический критерий Манна-Уитни (Mann-Whitney U test). Данные приведены как среднее \pm стандартная ошибка среднего, статистически достоверные различия принимали при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Согласно полученным данным в ответ на частичную гепатэктомию в костном мозге мышей наблюдается активация пролиферации CD45lowCD117+ стволовых клеток, на что указывает увеличение их количества в данной ткани (Табл. 1).

Однако интенсификации выхода стволовых клеток в периферическую кровь не наблюдается, так как данный показатель не отличается от значений у интактных животных.

Значительный рост содержания CD45lowCD117+ клеток в печени оперированных мышей, по всей видимости, не связан с их миграцией из костного мозга, а объясняется их пролиферацией в печени (Табл. 1).

Таблица 1

Содержание CD45lowCD117+ стволовых клеток в костном мозге, крови и печени животных после частичной гепатэктомии

| | Костный мозг | Кровь | Печень |
|------------------------|--------------------|-----------------|-------------------|
| Интактные | 23,68 \pm 4,2 | 2,96 \pm 0,48 | 27,23 \pm 8,14 |
| Частичная гепатэктомиа | 63,55 \pm 11,66* | 1,74 \pm 0,26 | 195,2 \pm 44,4* |

* отличия от интактной группы достоверны ($P < 0,05$)

При частичной нефрэктомии изменение содержания стволовых клеток исследуемого фенотипа в системе костный мозг – периферическая кровь – поврежденный орган свидетельствует об активации миграции данных клеток в ответ на повреждение (Табл. 2).

Таблица 2

Содержание CD45lowCD117+ стволовых клеток в костном мозге, крови и почках животных после частичной нефрэктомии

| | Костный мозг, $\times 10^3$ /бедренная кость | Кровь, ед/1 мл | Почки, на 1000 лейкоцитов | |
|-----------------------|--|------------------|---------------------------|--------------------|
| | | | Оперированная | Контрлатеральная |
| Интактные | 23,68 \pm 4,2 | 2,96 \pm 0,48 | 25,8 \pm 5,7 | |
| Частичная нефрэктомия | 13,14 \pm 3,5* | 6,94 \pm 0,25* | 146,6 \pm 39,8* | 180,03 \pm 28,6* |

* отличия от интактной группы достоверны ($P < 0,05$)

Репаративная регенерация почек сопровождается снижением количества CD45lowCD117+ стволовых клеток в костном мозге и увеличением ко-

личества в крови и почках.

Следует отметить, что накопление стволовых клеток наблюдается не только в поврежденной, но и в контрлатеральной почках, что указывает на существенный вклад симметричного органа в репаративную регенерацию.

Перечисленные изменения сопровождаются и реакцией со стороны фагоцитирующих мононуклеаров. Так, в ответ на частичную гепатэктомию наблюдается накопление клеток Купфера в строме долек (Табл. 3).

Таблица 3
Содержание макрофагов в печени, ед/мм²

| Показатель | Интактные | Гепатэктомия |
|------------|--------------|-----------------|
| Макрофаги | 97,37 ± 4,47 | 115,71 ± 3,94*! |

* отличия от интактной группы достоверны (P < 0,05)

При частичной нефрэктомии отмечена сходная реакция макрофагов: они накапливаются в почках в ответ на повреждение, причем в межканальцевом интерстиции коркового (преимущественно) и мозгового вещества. Изменения содержания макрофагов в почечных клубочках отмечено не было (Табл. 4).

Обращает на себя внимание тот факт, что миграция макрофагов наблюдается как в оперированный, так и в неповрежденный орган. Однако в случае с контрлатеральной почкой накопление фагоцитирующих мононуклеаров обнаружено лишь в корковом веществе органа.

Таблица 4
Содержание макрофагов в почках, ед/мм²

| Показатель | | Интактные | Нефрэктомия | |
|----------------------------|-------------------|-------------|---------------------|------------------------|
| | | | Оперированная почка | Контрлатеральная почка |
| Межканальцевый интерстиций | Корковое вещество | 44,7 ± 2,08 | 101,9 ± 15,3*.# | 64,5 ± 7,2*.# |
| | Мозговое вещество | 14,7 ± 3,9 | 81,5 ± 24,8*.# | 8,49 ± 3,7# |
| Почечные клубочки | | 1,31 ± 0,69 | 9,3 ± 5,3 | 4,53 ± 1,92 |

* отличия от интактной группы достоверны (P < 0,05)

отличия между правой и левой почками достоверны (P < 0,05)

Таким образом, через одни сутки после повреждения печени наблюдается активация CD45lowCD117+ стволовых клеток, проявляющаяся в усилении их пролиферации в костном мозге и регенерирующем остатке печени. При частичной нефрэктомии также отмечается реакция стволовых клеток исследуемого фенотипа, заключающаяся в интенсифика-

ции их миграции из костного мозга к поврежденному и симметричному органу. Данные процессы, как при повреждении печени, так и при повреждении почек сопровождаются активным накоплением макрофагов в строме регенерирующих органов. Данные факты указывают на то, что большое значение в регуляции реакций стволовых клеток костномозгового происхождения принимает система фагоцитирующих мононуклеаров.

Литература

1. Broudy V. Stem cell factor and hematopoiesis // *Blood*.-1997.-V. 90, №4.-P. 1345-1364.
2. Dalakas E., Newsome P., Harrison D., Plevris J. Hematopoietic stem cell trafficking in liver injury// *FASEB J.* – 2005. – Vol. 19. – P.1225 – 1231.
3. Guettier C. Which stem cells for adult liver? // *Annales de Pathologie.* - 2005.-V.25, №1. - P.33-44.
4. Knolle P.A. Local control of the immune response in the liver // *Immunological reviews.* - 2000. - V. 174. - P. 21-34.
5. Reule S., Gupta S. Kidney regeneration and the role of stem cells // *Organogenesis.* – 2011. – V. 7, № 2. – P. 135-139.
6. Ricardo S. D., Goor H. V., Eddy A.A. Macrophage diversity in renal injury and repair // *J Clin Invest.* – 2008. – V. 118, № 11. – P. 3522-3530.