

УДК 57.086.82, 57.086.833, 576.364, 576.535.5

©Коллектив авторов

ГЕПАТОГЕННАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ВЗРОСЛОЙ И ФЕТАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ *IN VITRO*

И.В. Холоденко^{1*}, Р.В. Холоденко², Г.В. Манукьян³, К.Н. Ярыгин¹

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121, Москва, Погодинская ул., д. 10, стр. 8;

тел.: +7(499)246-69-80; факс: +7(499)245-08-57; эл. почта: irkhol@yandex.ru

²Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

³Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского, Москва

Печень обладает выраженной способностью к регенерации, которую в большинстве случаев обеспечивают гепатоциты. В условиях острого или хронического повреждения регенеративная способность гепатоцитов существенно снижается. В частности, при алкогольном циррозе, репаративные механизмы не активируются, и таким пациентам может помочь либо трансплантация органа, либо современные методы регенеративной медицины. В клинических испытаниях, проведенных с участием пациентов с различными формами болезни печени, которым трансплантировали аутологичные стволовые клетки костного мозга, были получены многообещающие результаты. Однако для повышения эффективности такого лечения необходимо осуществлять поиск более подходящих источников прогениторных клеток. В данной работе мы выделили стромальные клетки из биоптатов печени доноров, больных алкогольным циррозом, провели их морфологический и фенотипический анализ, а также оценили гепатогенный потенциал этих клеток *in vitro*. В качестве сравнения использовали стромальные клетки фетальной печени. Оба типа клеток в ходе гепатогенной дифференцировки экспрессировали маркеры гепатоцитов и секретируют альбумин. Эти результаты могут служить основой для разработки нового метода при лечении терминальных стадий заболеваний печени. Выделенные из биоптатов стромальные клетки длительное время пролиферируют в культуре, что дает возможность получать их большие количества для последующей дифференцировки в гепатоцитоподобные клетки и для аутологичной трансплантации.

Ключевые слова: стромальные клетки взрослой печени, стромальные клетки фетальной печени, гепатогенная дифференцировка, алкогольный цирроз, гепатоцит-подобные клетки

DOI 10.18097/PBMC20166206674

ВВЕДЕНИЕ

В печени взрослого человека количественно преобладают гепатоциты, составляющие 70-80% общего числа клеток. Гепатоциты и эпителиальные клетки желчных протоков дифференцируются в процессе онтогенеза из эндодермальных бипотентных прогениторных клеток, называемых гепатобластами [1]. Другие печеночные клетки, такие как эндотелиальные клетки, звёздчатые клетки (клетки Ито), резидентные макрофаги (клетки Купфера) и стромальные фибробласты, происходят из мезодермальных предшественников. Большинство важнейших функций печени выполняют гепатоциты, осуществляющие синтез, аккумуляцию и деградацию метаболитов, обезвреживание токсичных веществ, синтез белка, метаболизм глюкозы, продукцию желчи и другие. Поэтому гепатоциты являются важным объектом биомедицинских исследований, в частности, в области регенеративной медицины и разработки/скрининга новых лекарственных препаратов. В настоящее время изолированные первичные гепатоциты служат “золотым стандартом” в моделях *in vitro*, поскольку экспрессируют большое количество белков-транспортёров и ферментов, участвующих в метаболизме лекарственных веществ [2]. В регенеративной медицине одним из перспективных подходов, который может служить

альтернативой ортотопической трансплантации печени, считается трансплантация гепатоцитов пациентам с терминальной стадией поражения печени (включая хронические вирусные гепатиты, цирроз печени на фоне хронического алкоголизма и др.) [3, 4]. Однако, как скрининг лекарственных препаратов, так и терапия гепатоцитами требуют продукции большого количества последних. К сожалению, гепатоциты не способны длительное время пролиферировать в культуре, что делает невозможной их экспансию *ex vivo* [5]. Кроме того, изолированные гепатоциты в процессе манипуляций *in vitro* могут утрачивать некоторые свойства, например, в них существенно снижается активность цитохрома P450 [6]. Поэтому многие исследователи занимаются поиском альтернативных источников исходного клеточного материала для получения гепатоцитов [7, 8]. Таким материалом с большой вероятностью могут стать мезенхимальные стволовые клетки, выделенные из различных тканей, гемопоэтические стволовые клетки и ткань фетальной печени, в которой содержится большое количество прогениторных клеток, обладающих широким дифференцировочным потенциалом [9], а также резидентные стволовые клетки печени.

Печень обладает выраженной способностью к регенерации в условиях химического повреждения или после частичной гепатэктомии [3, 10]. В основном

регенерацию печени обеспечивают гепатоциты, которые в ходе нескольких раундов пролиферации восполняют клеточную массу органа. Однако регенеративный потенциал гепатоцитов при остром или хроническом повреждении снижается [3]. В таких ситуациях регенеративную функцию выполняют резидентные стволовые (прогениторные) клетки печени [11]. В нескольких работах было показано, что прогениторные клетки печени, имеющие эпителиоподобную морфологию, заселяют порталную и перипортальную области долек [12]. В условиях повреждения они дифференцируются в зрелые гепатоциты и холангиоциты. Однако CD фенотип и дифференцировочный потенциал этих бипотентных клеток-предшественников остаются не полностью охарактеризованными [13]. Резидентные стволовые клетки печени могут служить богатым источником зрелых гепатоцитов для аутологичной трансплантации и для скрининга лекарственных препаратов, но и они нуждаются в дальнейшей характеристике. Возможно, что наряду с описанными выше эпителиоподобными прогениторными клетками, ткань печени содержит стволовые/прогениторные клетки в других компартментах, прежде всего в строме. Существование минорных субпопуляций плюрипотентных клеток, способных дифференцироваться в клетки всех трёх зародышевых листков, в том числе и в гепатоцитоподобные клетки, продемонстрировано в составе культур мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из различных тканей [14, 15].

В настоящей работе из биопсии печени пациентов с алкогольным циррозом, в условиях обычно используемых для получения культур мезенхимальных стромальных клеток, мы выделили культуру клеток, способных дифференцироваться в альбумин-продуцирующие гепатоцитоподобные клетки и охарактеризовали их морфологически и фенотипически.

МЕТОДИКА

Выделение и культивирование стромальных клеток из биоптата печени

Забор биопсийного материала осуществлялся в Отделении экстренной хирургии и порталной гипертензии РНЦХ имени акад. Б.В. Петровского на базе городской клинической больницы имени А.К. Ерамишанцева с соблюдением всех правил антисептики в условиях оперблока высококвалифицированными специалистами и с информированного согласия больных. Биоптаты печени были получены от трёх пациентов с алкогольным циррозом. Кусочек ткани печени (~1 см³) помещали в раствор Хэнкса ("ПанЭко", Россия) с добавлением антибиотика/антимикотика ("Gibco", США) для предотвращения бактериальной/грибковой контаминации и тщательно промывали от элементов крови, производя несколько смен буфера. Ткань печени переносили в чашки Петри, измельчали с помощью скальпеля и инкубировали в 0,1%-ном растворе коллагеназы I типа ("Gibco") в течение 30 мин

при 37°C. По окончании инкубации суспензию центрифугировали в течение 5 мин при 300 g. Осадок ресуспендировали в полной ростовой среде DMEM/F12, содержащей 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (FBS), 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (все – "Gibco"), и переносили в культуральные флаконы площадью 75 см² ("Greiner", США). Культивирование осуществляли в стандартных условиях в CO₂ инкубаторе (37°C, 5% CO₂, 80% влажности). При достижении 80-90% конфлюентности клетки снимали с пластика раствором трипсина/Версена ("ПанЭко"), отмывали центрифугированием, подсчитывали в камере Горяева и высевали на новые флаконы (75 см²) по 2,5×10⁵ клеток. Культура стромальных клеток фетальной печени любезно предоставлена Научным центром акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова. Культивирование этих клеток осуществляли в тех же условиях и в той же ростовой среде, что и стромальные клетки из биоптатов печени взрослых доноров.

Морфологический анализ клеточных культур

Морфологические особенности культур стромальных клеток, выделенных из взрослой и фетальной печени, оценивались на протяжении всего периода культивирования и на разных стадиях дифференцировки с использованием фазово-контрастной микроскопии с применением светового микроскопа (Zeiss Axiovert 40CFL, Германия) и фотокамеры (Nikon D5000).

Анализ экспрессии поверхностных маркеров

Стромальные клетки взрослой и фетальной печени снимали с подложки раствором трипсина/Версена, дважды отмывали в PBS ("ПанЭко"), дополненном 1% FBS и 0,02% азидом натрия. Клетки (5×10⁵ на образец) инкубировали с флуоресцентно-мечеными антителами к антигенам клеточной поверхности CD34, CD45, CD44, CD90, CD91, CD166, CD227, CD326 (все – "BD Bioscience", США), Met ("Santa Cruz Biotechnology", США) в течение 1 ч при 4°C в темноте. После этого клетки дважды отмывали в PBS центрифугированием, переносили суспензию в цитометрические пробирки и проводили измерение на проточном цитофлуориметре EPICS ELITE ("Beckman Coulter", США). В каждом образце регистрировали не менее 1×10⁴ событий. Обработку результатов проводили в программе WinMDI.

Гепатогенная дифференцировка

Для гепатогенной дифференцировки использовали 2-х стадийный протокол. Стромальные клетки взрослой и фетальной печени после 3-его пассажа высевали в лунки 12-ти луночного планшета ("Greiner") по 5×10⁵ клеток/лунка в полной ростовой среде. Через 24 ч производили смену ростовой среды на DMEM/F12 с 2 mM GlutaMAX с добавлением 0,5% FBS (все – "Gibco"), 10 нг/мл фактора роста гепатоцитов (HGF) и 100 нг/мл Активина А ("Sigma", США). На следующем этапе клетки культивировали

в среде DMEM/F12 с 2 мМ GlutaMAX, содержащей 15 мМ HEPES, 2 мкг/мл инсулина, 10 нг/мл фактора роста фибробластов-4 (FGF-4), 10 нг/мл фактора роста гепатоцитов (HGF), 10 нг/мл онкостатина М и 10^{-7} М дексаметазона (все – “Sigma”). В каждой из сред клетки культивировали в течение 10 дней со сменой среды каждые 2 дня.

Анализ экспрессии гепатоцитарных маркеров

По окончании каждой из стадий дифференцировки клетки снимали с подложки раствором трипсина/Версена и анализировали экспрессию соответствующих маркеров на проточном цитофлуориметре. После отмывки в PBS суспензию клеток фиксировали 2%-ным параформальдегидом (“Sigma”) в течение 20 мин при комнатной температуре. После двух отмывок в PBS проводили пермеабиллизацию клеток 0,6% раствором сапонина (“Sigma”) в течение 20 мин при комнатной температуре. Блокирование неспецифического связывания (30 мин при комнатной температуре) и последующие отмывки проводили в PBS, содержащем 1% FBS и 0,1% Твин-20 (“Sigma”). Инкубацию с первичными антителами к маркерам гепатогенной дифференцировки α -фетопротейну и преальбумину (все – “Santa Cruz Biotechnology”) проводили в течение 1 ч при комнатной температуре. После осаждения и отмывки клетки инкубировали с антивидовыми FITC-мечеными антителами (“Sigma”) в течение 1 ч при комнатной температуре, дважды отмывали в PBS и переносили в цитометрические пробирки. Измерение проводили на проточном цитофлуориметре EPICS ELITE (“Beckman Coulter”). В каждом образце регистрировали не менее 1×10^4 событий. Обработку результатов проводили в программе WinMDI.

Вестерн-блоттинг

После каждой стадии дифференцировки собирали из лунок кондиционированную среду, центрифугировали при 500 g 20 мин для осаждения клеточного дебриса и переносили в новые пробирки. Кондиционированную среду концентрировали на центрифужных фильтрах Amicon Ultra 10 MWCO (“Millipore”, США), после чего в течение 24 ч проводили диализ части образца, используя ячейки для микродиализа Slide-A-Lyzer (“Thermo Fisher Scientific”, США). В образцах после диализа измеряли общее количество белка по методу Брэдфорд. Электрофорез проводили в полиакриламидном геле (10%), используя рамку MV-1 для вертикального электрофореза (“Хеликон”, Россия), на дорожку наносили 60 мкг белка. В качестве контроля использовали бычий сывороточный альбумин и человеческий сывороточный альбумин (все – “Sigma”) по 10 мкг на дорожку. В качестве белковых стандартов использовали цветные маркеры (“BioRad”, “Thermo Scientific”, США). По окончании электрофореза белки из геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану методом полусухого переноса, используя камеру V10-SDB (“Biostep”, Германия). После переноса нитроцеллюлозную мембрану дважды промывали

в PBS, содержащем 0,05% Твин-20. Сайты неспецифического связывания блокировали 5%-ным сухим обезжиренным молоком (“Roth”, Германия) в течение 40 мин при комнатной температуре и постоянном покачивании. После двух отмывок мембрану инкубировали с антителами к человеческому альбумину (клон HSA-11, титр 1:6000; “Sigma”) 1 ч при комнатной температуре. После двух отмывок мембрану инкубировали с антивидовыми антителами, мечеными пероксидазой хрена (титр 1:6000, “Sigma”) 1 ч при комнатной температуре. Визуализацию окрашивания проводили, используя Metal Enhanced DAB Substrate Kit (“Thermo Scientific”), согласно методике производителя. После развития окрашивания реакцию останавливали, промывая мембрану дистиллированной водой.

Прямой твёрдофазный ИФА

Образцы кондиционированной среды после концентрирования и диализа раскапывали по 100 мкл в лунки 96-ти луночного планшета (ELISA-plate microlon H.B., “Greiner”) в трёх повторах каждый образец и оставляли при 4°C на ночь для сорбции белка. Далее проводили блокировку сайтов неспецифического связывания 2%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина в течение 1,5 ч при комнатной температуре. Лунки трижды промывали PBS, содержащем 0,05% Твин-20, на автоматическом вошере Autowash II (“Labsystems”, Испания). Инкубацию с антителами к человеческому альбумину (клон HSA-11, титр 1:6000; “Sigma”) проводили в течение 2 ч при комнатной температуре, после чего проводили три отмывки и инкубировали с антивидовыми антителами, мечеными пероксидазой хрена (титр 1:6000, “Sigma”), 40 мин при комнатной температуре. По окончании инкубации лунки промывали три раза и вносили в каждую лунку по 100 мкл проявителя (субстрат-хромогенная смесь ТМБ, “Иммунотех”, Россия). После развития окрашивания реакцию останавливали добавлением в каждую лунку 50 мкл 10% H_2SO_4 . Измерение оптической плотности проводили при 450 нм на планшетном спектрофотометре Multiscan FC (“Thermo Scientific”).

Статистическая обработка результатов

Анализ цитометрических результатов проводили в программе WinMDI. Построение графиков выполняли в программе SigmaPlot. Представленные результаты являются либо средним значением как минимум трёх независимых экспериментов, либо репрезентативными данными. Результаты, представленные в виде цитометрических гистограмм (например, рис. 2, 3 и 5), являются репрезентативными данными, то есть представлен результат, полученный в одном эксперименте, за одно измерение. А на рисунке 7 представлены средние значения данных ИФА, рассчитанные из результатов, полученных в трёх экспериментах. В таблице также представлены результаты, полученные после трёх измерений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологическая характеристика стромальных клеток фетальной и взрослой печени

Стромальные клетки фетальной печени в культуре имели классическую фибробластоподобную морфологию (рис. 1А). В культурах стромальных клеток взрослой печени можно выделить две субпопуляции, одна из которых характеризовалась фибробластоподобной морфологией, другая – эпителиоподобной морфологией. Эпителиоподобные клетки представляли собой локусы с плотными межклеточными контактами и низким соотношением цитоплазма/ядро (рис. 1Б). Наличие двух морфологически отличающихся субпопуляций было характерно для всех культур, полученных от трёх доноров, на ранних пассажах (до 5 пассажа). Ранее мы показали [16], что при длительном пассировании (8 и более пассажей) культура становилась морфологически однородной с эпителиоподобными клетками, которые вообще не экспрессировали маркеров мезенхимальных клеток, что может свидетельствовать о наличии мезенхимально-эпителиального перехода в культуре. В литературе представлены данные о том, что воздействие алкоголя способствует эпителиально-мезенхимальному переходу, когда эпителиоподобные прогениторные клетки *in vitro* приобретают веретенообразную морфологию миофибробластов [17]. Этот процесс лежит в основе развития фиброзной ткани *in vivo* [18]. С другой стороны, многие авторы сходятся во мнении, что в процессе эмбриогенеза прогениторные

клетки печени происходят из мезэндодермы [19], что предполагает возможность при определённых условиях мезенхимально-эпителиального и эпителиально-мезенхимального переходов.

Фенотипическая характеристика стромальных клеток фетальной и взрослой печени

Фенотип стромальных клеток фетальной печени человека был охарактеризован нами ранее [20]. Эти клетки экспрессировали маркеры, характерные для мезенхимальных стромальных клеток, и не экспрессировали маркеры эпителиальных и гемопоэтических клеток.

Фенотипический анализ стромальных клеток взрослой печени проводили, используя клетки на 3-4 пассаже. Культуры стромальных клеток, полученные от трёх пациентов с алкогольным циррозом, проявляли похожие профили экспрессии поверхностных маркеров. Они не экспрессировали маркеры гемопоэтических клеток CD34 и CD45. Маркеры, характерные для мезенхимальных стромальных клеток CD44 и CD90, выявлены примерно у 30% клеток. Небольшая популяция клеток (около 10-12%) взрослой печени экспрессировала маркеры, характерные для эпителиальных клеток CD166 (ALCAM) и CD227 (MUC), но не эпителиальные маркеры CD91 и CD326 (EpCAM). Результаты фенотипического анализа представлены в таблице; примечательно, что более 50% стромальных клеток взрослой печени экспрессировали рецептор фактора роста гепатоцитов Met (рис. 2).

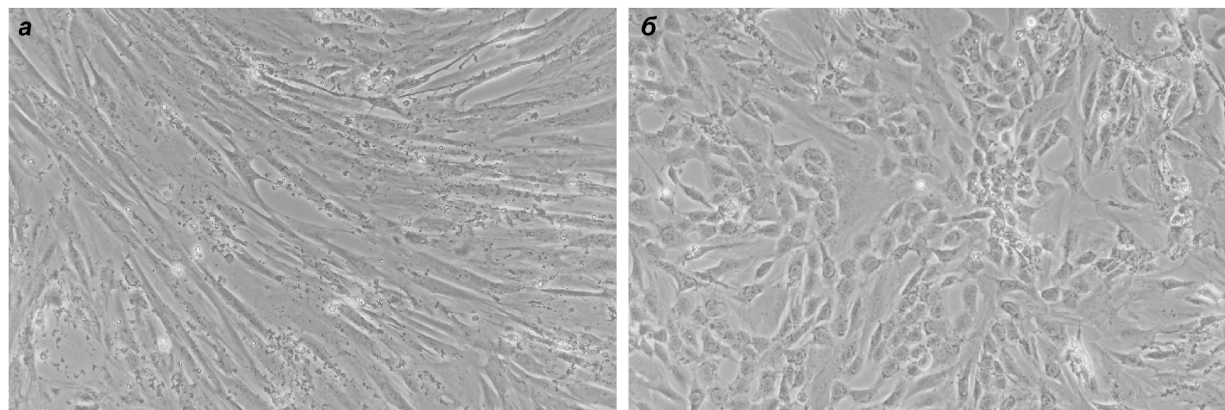


Рисунок 1. Морфология стромальных клеток фетальной (А) и взрослой (Б) печени в культуре. Световая фазово-контрастная микроскопия, объектив 10х.

Таблица. Фенотипический анализ стромальных прогениторных клеток, выделенных из биоптатов печени больных алкогольным циррозом

Маркер	% положительно окрашенных клеток		
	Донор 1	Донор 2	Донор 3
CD90 (Thy-1)	28±3,5	32±4	30±3,5
CD44	29±3	33±4	28±2
CD166 (ALCAM)	10±2	12±3	11±2,5
CD227 (MUC)	11±3	12±2,5	10±2
Met	58±2,5	60±3	59±2
CD34	-	-	-
CD45	-	-	-
CD326 (EpCAM)	-	-	-
CD91	-	-	-

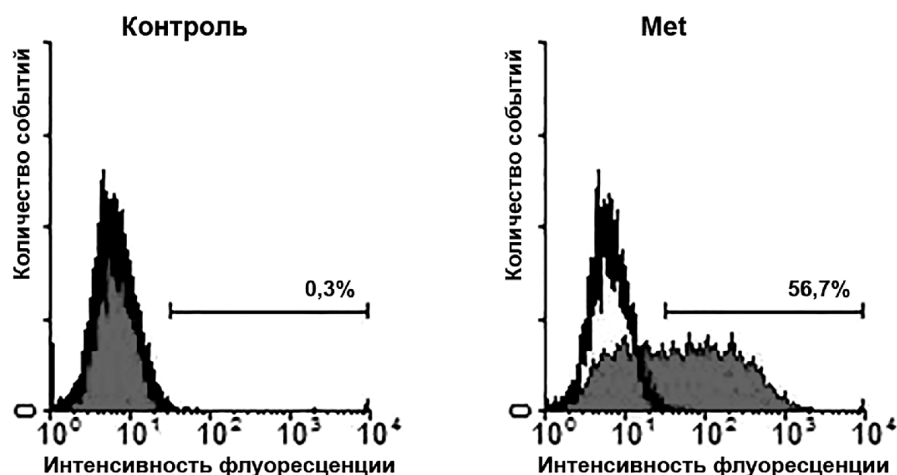


Рисунок 2. Экспрессия Met стромальными прогениторными клетками, выделенными из биоптата печени пациента с алкогольным циррозом. По оси ординат - количество событий, по оси абсцисс - относительная интенсивность флуоресценции. Контроль - окрашивание антивидовыми антителами.

Таким образом, фенотипически, как и морфологически, полученные нами клетки также четко разделяются на две субпопуляции, одна из которых экспрессирует на высоком уровне маркеры мезенхимальных клеток CD90 и CD44, другая – маркеры эпителиальных клеток CD166 и CD227. Однако, в отличие от прогениторных клеток взрослой печени, описанных в литературе, полученные нами клетки не экспрессировали ЕрСАМ (CD326), маркер, наиболее часто используемый для идентификации прогениторных клеток печени [21]. На ткани взрослой печени человека показана экспрессия ЕрСАМ клетками, формирующими желчные протоки или каналы Геринга (то есть гепатоцитарными прогениторными клетками). Зрелые взрослые гепатоциты этот маркер не экспрессируют. Количество ЕрСАМ-позитивных гепатобластов быстро уменьшается после рождения. Такака и др. [22] на мышиных клетках впервые показали, что ЕрСАМ является самым ранним и транзитным маркером гепатобластов в течение гепатогенеза. Другие авторы групп показали, что ЕрСАМ, экспрессируемый на гепатоцитарных прогениторных клетках грызунов, в ходе дифференцировки *in vitro* перестаёт экспрессироваться [23]. Помимо этого, экспрессия ЕрСАМ может существенно различаться при разных патологиях печени. Sancho-Vrg и др. [24] показали, что у пациентов с гепатитом С и с циррозом, вызванным вирусом гепатита С, экспрессия этого маркера существенно ниже, чем у пациентов с алкогольным гепатитом. Таким образом, отсутствие экспрессии ЕрСАМ в клетках, выделенных из биоптатов печени больных алкогольным циррозом, может быть, с одной стороны, характерной особенностью данных клеток, обусловленной патогенезом заболевания, с другой, – свидетельствовать о том, что эти клетки находятся в преддифференцированном состоянии. В пользу последнего предположения также свидетельствует тот факт, что большая часть клеток в культуре экспрессировала рецептор фактора роста гепатоцитов Met.

Гепатогенная дифференцировка стромальных клеток фетальной и взрослой печени

Первый этап гепатогенной дифференцировки подразумевает получение коммитированной культуры с гепатогенной спецификацией. Одним из основных маркеров незрелых гепатоцитов является α -фетопротеин – белок, который продуцируется клетками печени в период внутриутробного развития. Его продукция резко снижается после рождения. В норме зрелые гепатоциты этот белок не вырабатывают. По окончании первой стадии дифференцировки была проанализирована экспрессия α -фетопротеина в стромальных клетках взрослой и фетальной печени. Более 80% обоих типов клеток начинали экспрессировать этот белок, тогда как те же клетки, культивируемые в стандартных условиях, α -фетопротеин не экспрессировали (рис. 3).

В результате следующего этапа дифференцировки происходило созревание коммитированных клеток в гепатоцитоподобные клетки. С клетками, выделенными из фетальной печени, происходили морфологические изменения. Они становились более уплощёнными с кубоидальной эпителиоподобной формой с плотными контактами между клетками и гранулированной цитоплазмой (рис. 4А). Заметных морфологических изменений в культуре стромальных клеток, выделенных из взрослой печени, не наблюдалось, однако на заключительном этапе дифференцировки появлялись многоядерные клетки (рис. 4Б).

По окончании этого этапа оба типа клеток, и фетальной и взрослой печени, практически прекращали экспрессировать α -фетопротеин (данные не представлены). При этом более 70% стромальных клеток фетальной печени и более 60% стромальных клеток взрослой печени экспрессировали преальбумин (рис. 5).

Фенотипический анализ полученных гепатоцитоподобных клеток показал, что в клетках фетальной печени существенно (в 4 и 2 раза соответственно) снижалась экспрессия мезенхимальных

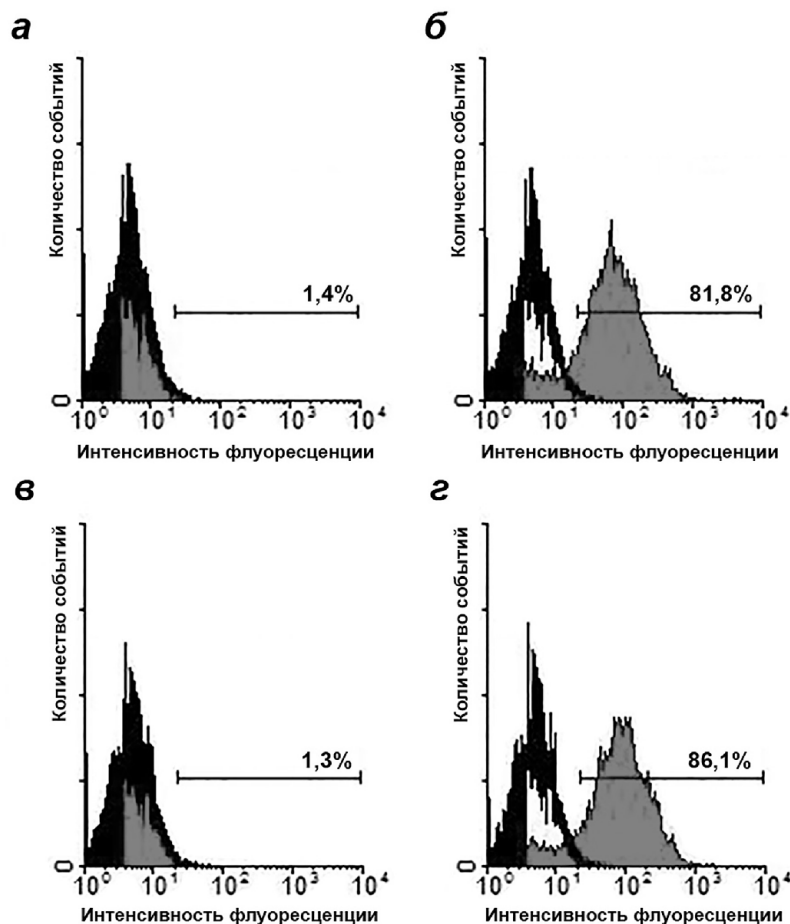


Рисунок 3. Экспрессия α -фетопротейна в стромальных клетках, выделенных из фетальной (А, Б) и взрослой (В, Г) печени. А, В - контрольные клетки, культивируемые в обычной ростовой среде; Б, Г - клетки, культивируемые в дифференцировочной среде.

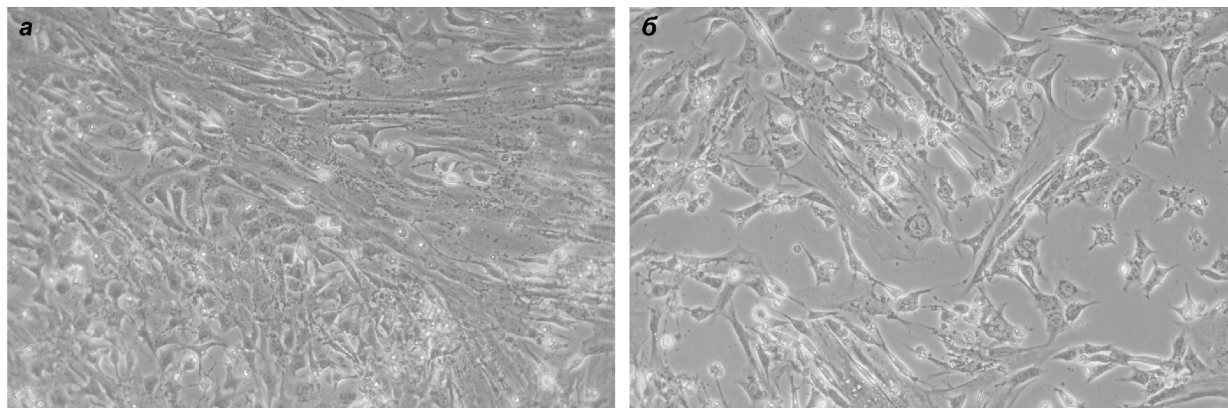


Рисунок 4. Морфология стромальных клеток фетальной (А) и взрослой (Б) печени по окончании гепатогенной дифференцировки. Световая фазово-контрастная микроскопия, объектив 10 \times .

маркеров CD90 и CD44 (рис. 6), и незначительно увеличивалась экспрессия CD91 и CD326 (данные не представлены). Снижение экспрессии мезенхимальных маркеров на стромальных клетках фетальной печени подтверждает прохождение трансдифференцировки в эндодермальном направлении.

Значимых фенотипических изменений по маркерам CD90, CD44, CD91 и CD326 в культурах гепатоцитоподобных клеток, полученных из стромальных клеток взрослой печени, не наблюдалось (данные не представлены).

*Функциональная оценка гепатоцитоподобных клеток, полученных в процессе *in vitro* дифференцировки стромальных клеток, выделенных из фетальной и взрослой печени*

Зрелые гепатоциты характеризуются секрецией альбумина. Двумя методами мы проанализировали секрецию альбумина стромальными клетками, выделенными из фетальной и взрослой печени, после двух стадий дифференцировки. Иммуноферментный анализ кондиционированных сред показал, что стромальные клетки, выделенные из взрослой

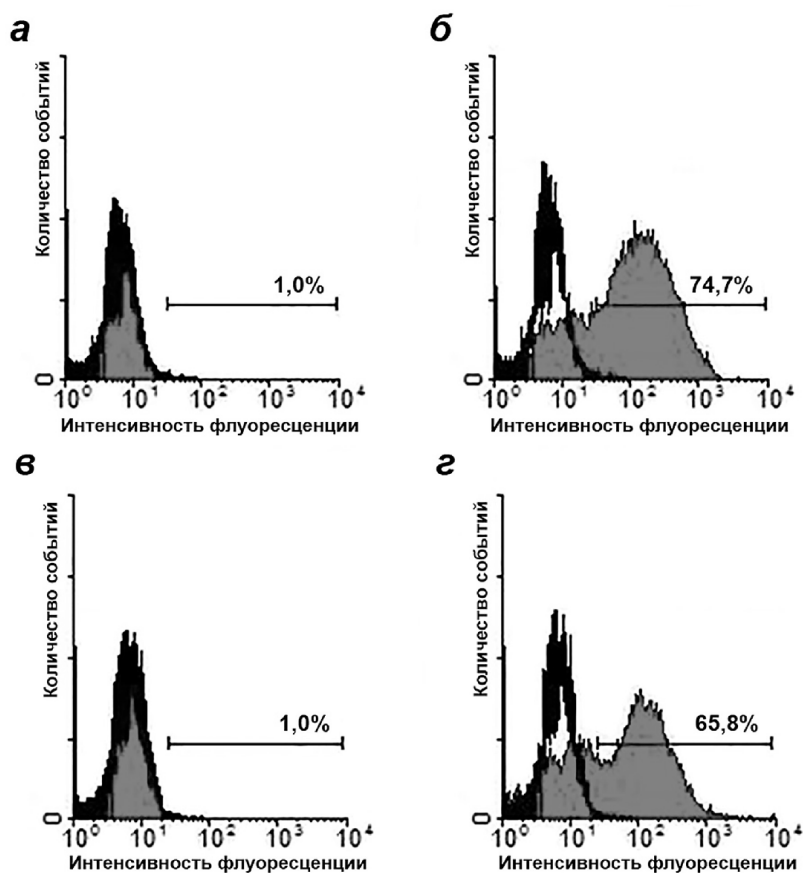


Рисунок 5. Анализ экспрессии преальбумина в стромальных клетках фетальной (А, Б) и взрослой печени (В, Г) на заключительном этапе гепатогенной дифференцировки. А, В - клетки, культивируемые в стандартной ростовой среде; Б, Г - клетки, культивируемые в дифференцировочной среде.

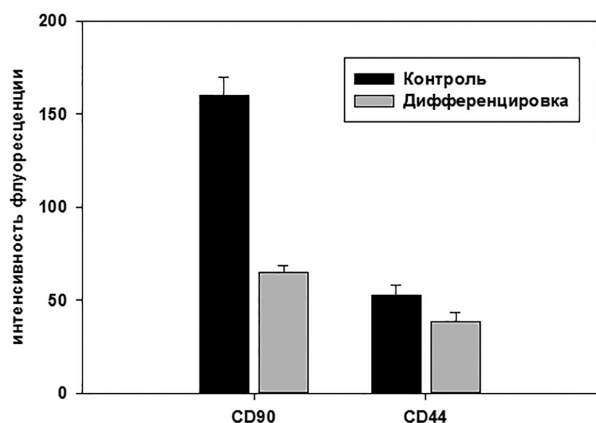


Рисунок 6. Изменение экспрессии мезенхимальных маркеров в клетках фетальной печени после гепатогенной дифференцировки.

печени, начинали секретировать альбумин уже после первой стадии дифференцировки, и уровень его секреции оставался практически неизменным до конца второй стадии (рис. 7А). Уровень секреции альбумина фетальными клетками был несколько выше на заключительном этапе дифференцировки, хотя по окончании первого дифференцировочного этапа фетальные клетки в отличие от взрослых не секретировали альбумин (рис. 7А). Тот факт, что стромальные клетки взрослой печени, в отличие от фетальных клеток, секретировали альбумин

и на более ранней стадии дифференцировки ещё раз подтверждает их преддифференцированное коммитированное состояние.

Данные иммуноферментного анализа по секреции альбумина были подтверждены Вестерн-блоттингом. На рисунке 7Б представлен репрезентативный эксперимент анализа кондиционированных сред секреции альбумина стромальными клетками взрослой и фетальной печени на заключительном этапе дифференцировки. Контрольные клетки, культивируемые в стандартной ростовой среде, альбумин не секретировали.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе мы впервые получили стромальные прогениторные клетки из печени пациентов, больных алкогольным циррозом, охарактеризовали их морфологически и фенотипически, а также провели их дифференцировку в гепатоцитоподобные клетки. В отличие от печеночных прогениторных клеток, описанных в литературе, полученные нами клетки хорошо растут в стандартной среде, используемой для культивирования мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из костного мозга или других тканей, а также фибробластов. Это может свидетельствовать о том, что это совершенно разные клетки, происходящие из разных источников.

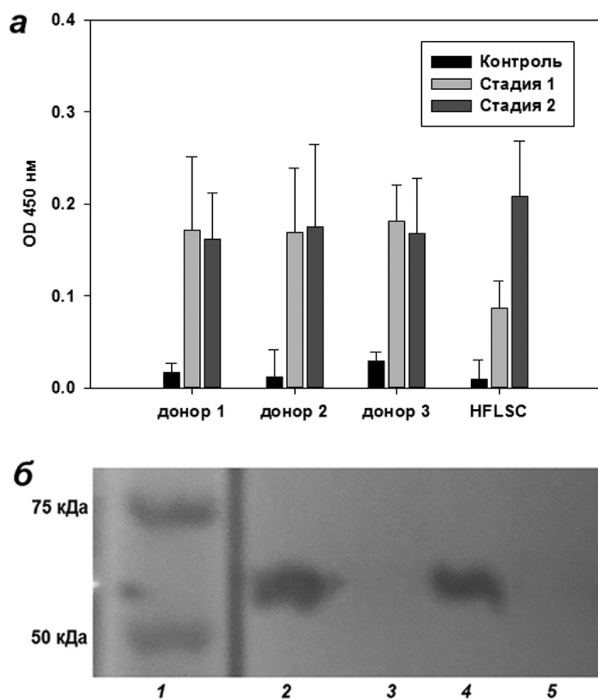


Рисунок 7. Анализ секреции альбумина. А - ИФА альбумина в кондиционированных средах после двух стадий гепатогенной дифференцировки. Представлены значения оптической плотности за вычетом значений контрольной среды. Б - Вестерн-блот анализ альбумина в кондиционированной среде клеток после второй стадии гепатогенной дифференцировки. 1 - цветные маркеры, 2 - клетки взрослой печени после дифференцировки, 3 - контрольные клетки взрослой печени, 4 - фетальные клетки после дифференцировки, 5 - контрольные фетальные клетки.

Данное утверждение, конечно, нуждается в более строгих доказательствах. Мы провели гепатогенную дифференцировку этих клеток. Для сравнения, в тех же дифференцировочных условиях мы культивировали стромальные клетки, полученные из фетальной печени. На конечном этапе дифференцировки оба типа клеток начинали экспрессировать/секретировать альбумин.

В целом, результаты, полученные в работе, демонстрируют, что даже в условиях терминальной фазы заболевания печени, возможно выделение прогениторных клеток, которые в условиях *in vitro* способны длительное время пролиферировать (более 11 пассажей) и достаточно быстро дифференцироваться в альбумин-продуцирующие гепатоцитоподобные клетки. Потенциально эти клетки могут служить перспективным источником для аутологичной трансплантации с целью восполнения клеточной массы печени при серьезных поражениях, когда другие терапевтические методы, кроме трансплантации органа или его части, неэффективны.

Работа поддержана грантом РНФ (№14-15-00648).

ЛИТЕРАТУРА

1. Clotman F., Lemaigre F.P. (2006) Cell Cycle, **5**, 168-171.
2. Hewitt N.J., Lechón M.J., Houston J.B., Hallifax D., Brown H.S., Maurel P., Kenna J.G., Gustavsson L., Lohmann C., Skonberg C. et al. (2007) Drug Metab. Rev., **39**, 159-234.
3. Fox I.J., Roy-Chowdhury J. (2004) J. Hepatol., **40**, 878-886.
4. Soltys K.A., Soto-Gutiérrez A., Nagaya M., Baskin K.M., Deutsch M., Ito R., Shneider B.L., Squires R., Vockley J., Guha C. et al. (2010) J. Hepatol., **53**, 769-774.
5. Bhogal R.H., Hodson J., Bartlett D.C., Weston C.J., Curbishley S.M., Haughton E., Williams K.T., Reynolds G.M., Newsome P.N., Adams D.H. et al. (2011) PLoS ONE, **6**, e18222.
6. Terry C., Hughes R.D. (2009) Methods Mol. Biol., **481**, 25-34.
7. Gilchrist E.S., Plevris J.N. (2010) Liver Transpl., **16**, 118-129.
8. Yarygin K., Lupatov A., Kholodenko I. (2015) Clin. Interv. Aging., **1**, 1909-1924.
9. Chen Q., Khoury M., Limmon G., Choolani M., Chan J.K., Chen J. (2013) Stem Cells, **31**, 1160-1169.
10. Jochheim-Richter A., Rüdrieh U., Koczan D., Hillemann T., Tewes S., Petry M., Kispert A., Sharma A.D., Attaran F., Manns M.P. et al. (2006) Differentiation, **74**, 167-173.
11. Moreno R., Martinez-Gonzalez I., Rosal M., Farwati A., Gratacos E., Aran J.M. (2010) Stem Cells Dev., **19**, 1579-1588.
12. Haridass D., Narain N., Ott M. (2008) Curr. Opin. Organ Transplant., **13**, 627-632.
13. Wang J., Clark J.B., Rhee G.S., Fair J.H., Reid L.M., Gerber D.A. (2003) Cells Tissues Organs, **173**, 193-203.
14. Oh K., Shon S.Y., Seo M.W., Lee H.M., Oh J.-E., Choi E.Y., Lee D.-S., Park K.S. (2015) Exp. Mol. Med., **47**, e187.
15. Kuroda Y., Kitada M., Wakao S., Nishikawa K., Tanimura Y., Makinoshima H., Goda M., Akashi H., Inutsuka A., Niwa A. et al. (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **107**, 8639-8643.
16. Холоденко И.В., Холоденко Р.В., Манукян Г.В., Бурунова В.В., Ярыгин К.Н. (2016) Клеточные технологии в биологии и медицине, **3**, 147-151.
17. Shi X., Chang C.C., Basson M.D., Uyhaa A.L., Wei L., Zhang P. (2014) J. Stem Cell Res. Ther., **4**, 205.
18. Forbes S.J., Parola M. (2011) Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol., **25**, 207-217.
19. Schmelzer E. (2012) Liver Regeneration (Pedro Baptista, ed.). InTech. ISBN: 978-953-51-0622-7.
20. Лупатов А.Ю., Вдовин А.С., Вахрушев И.В., Полтавцева Р.А., Ярыгин К.Н. (2014) Клеточные технологии в биологии и медицине, **4**, 221-228.
21. Schmelzer E., Wauthier E., Reid L.M. (2006) Stem Cells, **24**, 1852-1858.
22. Tanaka M., Okabe M., Suzuki K., Kamiya Y., Tsukahara Y., Saito S., Miyajima A. (2009) Mech. Dev., **126**, 665-676.
23. Dollé L., Theise N.D., Schmelzer E., Boulter L., Gires O., van Grunsven L.A. (2015) Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., **308**, 233-250.
24. Sancho-Bru P., Altamirano J., Rodrigo-Torres D., Coll M., Millan C., Lozano J.J., Miquel R., Arroyo V., Caballería J., Gines P. et al. (2012) Hepatology, **55**, 1931-1941.

Поступила: 14. 09. 2016.
Принята к печати: 25. 10. 2016.

THE HEPATIC DIFFERENTIATION OF ADULT AND FETAL LIVER STROMAL CELLS *IN VITRO*

I.V. Kholodenko¹, R.V. Kholodenko², G.V. Manukyan³, K.N. Yarygin¹

¹Institute of Biomedical Chemistry (IBMC),

10/8 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia;

tel.: +7(499)246-69-80; fax: +7(499)245-08-57; e-mail: irkhol@yandex.ru

²Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

³Russian National Research Center of Surgery, Moscow, Russia

The liver has a marked capacity for regeneration. In most cases the liver regeneration is determined by hepatocytes. The regenerative capacity of hepatocytes is significantly reduced in acute or chronic damage. In particular, repair mechanisms are not activated in patients with alcoholic cirrhosis. Organ transplantation or advanced methods of regenerative medicine can help such patients. The promising results were obtained in clinical trials involving patients with various forms of liver disease who received transplantation of autologous bone marrow stem cells. However, to improve the effectiveness of such treatment it is necessary to search for more optimal sources of progenitor cells, as well as to evaluate the possibility of using descendants of these cells differentiated *in vitro*. In this study we isolated stromal cells from the liver biopsies of three patients with alcoholic cirrhosis, conducted their morphological and phenotypic analysis, and evaluated the hepatic potential of these cells *in vitro*. The stromal cells isolated from fetal liver were used for comparison. The results of this can serve as a basis for the development of a new method for the treatment of end-stage liver disease. The stromal cells isolated from the liver biopsies for a long time proliferate in a culture and this which makes it possible to expand them to large amounts for subsequent differentiation into hepatocyte-like cells and autologous transplantation.

Key words: adult liver stromal cells, fetal liver stromal cells, hepatic differentiation, alcoholic cirrhosis, hepatocyte-like cells