

УДК 577.3

ВЛИЯНИЕ ПАРАКРИННЫХ ФАКТОРОВ КОНДИЦИОНИРОВАННОЙ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЫ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ПРОДУКЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В НЕЙТРОФИЛАХ КРОВИ НА ФОНЕ АЦЕТАМИНОФЕН-ИНДУЦИРОВАННОЙ ПЕЧЕНОЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

© 2023 г. А.А. Темнов*, **, А.Н. Склифас*, В.К. Жалимов*, М.Г. Шарапов*, Р.С. Фадеев***, М.И. Кобякова***, Н.И. Кукушкин*., #, **К.А. Рогов******

*Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», Институтская ул., 3, Пушкино Московской области, 142290, Россия

**Московский физико-технический институт (государственный университет), Институтский пер., 9, Долгопрудный Московской области, 141701, Россия

***Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Институтская ул., 3, Пушкино Московской области, 142290, Россия

****НИИ морфологии человека Российского научного центра хирургии имени академика Б.В. Петровского, ул. Цюрупы 3, Москва, 117418, Россия

#E-mail: nikukushkin@mail.ru

Поступила в редакцию 24.11.2022 г.

После доработки 24.11.2022 г.

Принята к публикации 07.12.2022 г.

Изучено влияние кондиционированной среды, полученной при культивировании мезенхимальных стволовых клеток, на тяжесть системного воспалительного ответа, вызванного введением ацетаминофена, в том числе его отдаленное влияние на ткани печени. Использование фракции кондиционированной среды <30 кДа оказывало максимальное защитное действие. Белки этой фракции снижают выраженность системной воспалительной реакции и степень фиброза ткани печени в отдаленные сроки после введения токсина. При исследовании тканей печени экспериментальных животных выявлено снижение выраженности гранулоцитарной инфильтрации, коррелирующее со степенью некроза печеночной паренхимы (что подтверждается уровнем цитолитических ферментов). Фракция <30 кДа увеличивала спонтанную и уменьшала индуцированную форбол-12-мири-стат-13-ацетатом внутриклеточную продукцию активных форм кислорода. Результаты исследования показывают достоверное увеличение экспрессии макрофаг-ингибирующего фактора и тиоредоксина по сравнению с контролем на фоне повышенной спонтанной продукции активных форм кислорода в нейтрофилах.

Ключевые слова: ацетаминофен, печень, фиброз, стволовые клетки, кондиционированные среды.

DOI: 10.31857/S000630292301009X, EDN: OAFUWG

Передозировка ацетаминофена (АЦ), особенно связанная с истощением системы детоксикации глутатиона, приводит к тяжелым повреждениям паренхимы печени и индукции острой пе-

Сокращения: АЦ – ацетаминофен; NOX2 – НАДФН-оксидаза; АФК – активные формы кислорода; КС – кондиционированная среда; МСК – мезенхимальные стволовые клетки; КС МСК – кондиционированная среда, полученная при культивировании мезенхимальных стволовых клеток; ФМА – форбол-12-мири-стат-13-ацетат; МИФ – макрофаг-ингибирующий фактор, NET – нейтрофильные внеклеточные ловушки.

ченочной недостаточности, прогрессирование которой может привести к смерти больного [1, 2].

Активный метаболит АЦ, N-ацетил-пара-бензохинон, связывается с клеточными белками, приводит к деградации митохондрий гепатоцитов и повреждению митохондриальной ДНК, что вызывает гепатоцеллюлярную гибель [2]. В свою очередь массивный гепатоцеллюлярный некроз и выброс внутриклеточных белков из гепатоцитов в кровь вызывают активацию гранулоцитов и их миграцию в паренхиму печени [3]. Их роль в развитии дальнейшей гепатоцитарной недостаточ-

ности в настоящее время активно обсуждается. Некоторые авторы считают, что гиперактивные нейтрофилы усиливают печеночную недостаточность [4–6], в то время как другие исследователи утверждают, что нет прямых доказательств повреждения клеток, связанного с функцией нейтрофилов [7–12]. Однако не вызывает сомнений, что нейтрофилы мигрируют в ткань печени при токсическом воздействии АЦ [3].

Роль оксидного комплекса НАДФН (NOX2), продуцирующего активные формы кислорода (АФК), и его влияние на степень повреждения паренхимы печени неоднозначны. Некоторые авторы показали, что АЦ усиливает активность NOX2 в гепатоцитах, а его ингибирование значительно уменьшает гепатоцеллюлярную недостаточность [13].

Также нет единого мнения о влиянии АФК на процессы регенерации в ткани печени после воздействия АЦ. В частности, авторы работы [14] показали, что активация спонтанной продукции АФК в нейтрофилах будет способствовать регенерации ткани печени после воздействия АЦ, поскольку молекулы АФК, секретируемые нейтрофилами, могут способствовать развитию макрофагов и способствовать процессам регенерации печени после токсического действия АЦ.

С другой стороны, в работе [11] было показано, что у животных с блокировкой NOX2, нейтрофилы которых не могут генерировать АФК, уровень повреждения гепатоцитов, вызванный АЦ, и их способность к регенерации печени такие же, как и в контроле.

Нашими предыдущими исследованиями показано, что кондиционированная среда (КС), и особенно ее фракция <30 кДа, полученная при культивировании мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в атмосфере 10% O₂, оказывает защитное действие при АЦ-индуцированном остром повреждении печени [15, 16].

Отмечено, что клиническое улучшение сопровождается снижением уровня цитолитических ферментов в крови, при этом выраженность центробилярного некроза коррелирует с уровнем гранулоцитарной инфильтрации, наблюдаемой в гистологических срезах.

Цель исследования — сравнить клиническую картину ранних стадий АЦ-индуцированной печеночной недостаточности с функциональной активностью нейтрофилов под действием пептидов КС МСК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Моделирование острой печеночной недостаточности. Для эксперимента использовали мышьяк-самцов линии Valb/c с массой тела 22–24 г. Всем животным внутрибрюшинно вводили АЦ (270

мг/кг массы тела). Затем животных случайным образом распределяли на три группы. Животным контрольной группы (первая группа, $n = 15$) вводили подкожно культуральную среду с эмбриональной телячьей сывороткой в объеме 0.5 мл. Во второй группе (опытная, $n = 15$) животным вводили подкожно в объеме 0.5 мл КС, полученную в процессе культивирования МСК (общая фракция, концентрация белка 0.5 мг/мл). В третьей группе (опытная, $n = 15$) подкожно в объеме 0.5 мл вводили фракцию КС МСК <30 кДа.

Выделение стволовых клеток костного мозга. Костный мозг извлекали из бедренной кости мышшей Valb/c под общей анестезией Зоветилом. Для выделения моноклеарной фракции клеток костного мозга по стандартной методике использовали градиент плотности со стандартным раствором Lympholyte-N (Cedarlane, Канада). Суспензию моноклеарных клеток высевали в чашки Петри и культивировали в среде DMEM с добавлением 10%-й эмбриональной телячьей сыворотки в CO₂-инкубаторе во влажной атмосфере с 10% O₂, 5% CO₂ и 85% N₂.

Свойства МСК были подтверждены их остеогенной, хондрогенной и адипогенной дифференцировкой по стандартной операционной методике с использованием факторов роста [17].

Анализ фенотипического профиля МСК выявил следующие маркеры: 98.7% CD73+, 98.7% CD44+, 94.6% CD105+, 0.1% CD34+, 0.3% CD45+.

Получение кондиционированной среды при культивировании мезенхимальных стволовых клеток. После формирования клеточного монослоя его культуральную среду полностью заменяли и через трое суток объединяли с лизатом МСК.

Получение фракции <30 кДа. КС отделяли ультрафильтрацией через фильтр Minimate TFF Capsule Omega 30K (Pall, США) и выделяли фракцию, содержащую в основном белки с массой <30 кДа.

Гистология. Материалы для гистологического исследования отбирали через 4, 24 и 96 ч, а образцы тканей животных для оценки отдаленных эффектов отбирали через 10 суток после введения АЦ. Образцы биопсии брали у шести животных каждой группы.

Для патоморфологической оценки изменений ткани печени печень фиксировали в нейтральном забуференном 10%-м растворе формальдегида. Патоморфологические изменения в тканях печени оценивали по бальной системе со шкалой от 0 до 3 (0 баллов — без изменений, 1 балл — изменено более 1/3 площади, 2 балла — более 2/3 площади, 3 — 100% области изменений).

Биохимическое обследование. Фермент печени аспартатаминотрансферазу определяли в цельной крови перед экспериментом, а также через 4,

24, 48 и 96 ч после введения АЦ на приборе Re-flatron (ROCH, США).

Оценка внеклеточной ДНК. Концентрацию внеклеточной ДНК определяли с помощью набора для анализа двухцепочечной ДНК Quant-iT PicoGreen (Fisher Scientific, Landsmeer, Нидерланды) по методике, описанной ранее [18]. 10 мкл плазмы добавляли к 90 мкл трис-ЭДТА-буфера (10 mM трис-HCl, 1 mM ЭДТА, pH 7,5) в 96-луночном культуральном планшете. Каждая лунка содержала 100 мкл раствора PicoGreen (разбавленного 1 : 200 в трис-ЭДТА-буфере). Смесь инкубировали в течение 10 мин в темной комнате при комнатной температуре и измеряли ее флуоресценцию на спектрофлуориметре RF-6000 (Shimadzu, Япония) при длине волны возбуждения 480 нм и длине волны эмиссии 520 нм.

Выделение мРНК. Суммарную РНК выделяли из 4–6 мг печени с помощью реагентов ExtractRNA («Евроген», Россия) согласно протоколу производителя. Образцы печени гомогенизировали в тефлоновом гомогенизаторе в присутствии 1 мл реагента. Лизат инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре и центрифугировали при 18000 g в течение 10 мин. Супернатант переносили в новую пробирку, содержащую 0.2 мл хлороформа. Смесь интенсивно перемешивали, инкубировали 5 мин при комнатной температуре и центрифугировали при 18000 g в течение 10 мин при 4°C. Верхнюю фазу переносили в новую пробирку, содержащую 0.5 мл изопропанола, перемешивали, инкубировали 10 мин при комнатной температуре и центрифугировали при 18000 g в течение 10 мин. Осадок дважды промывали 75%-м этанолом. Полученный препарат тотальной РНК растворяли в 50 мкл воды без РНКазы и хранили при –20°C. Качество РНК проверяли по наличию 18s и 28s РНК при электрофорезе в агарозном геле.

Количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией. Для количественной ПЦР с обратной транскрипцией использовали реагенты компании «Евроген» (Россия). Для синтеза кДНК раствор тотальной РНК и 30 мКс олиго-d(T)15 праймера инкубировали при 70°C в течение 2 мин и сразу переносили на лед. Затем к смеси добавляли 11.5 мкл мастер-микса (1.3 mM dNTP, 0.02 мкл/мкл ингибитора РНКазы (RiboLock, ThermoFisher Scientific, США), 6 единиц M-MLV-ревертазы и 4 мкл 5-кратного буфера для M-MLV-ревертазы. Для завершения обратной транскрипции образцы инкубировали при 42°C в течение 50 мин. Полученную кДНК использовали для ПЦР в реальном времени с праймерами, специфичными к генам исследуемых белков и эталонного гена. Изменение уровня экспрессии генов рассчитывали по 2-ΔΔCt-методу [19].

Внутриклеточный анализ активных форм кислорода. Индуцируемую и спонтанную окислительную активность оценивали с использованием зонда DCFHDA (Sigma-Aldrich, США) (Ex 485 нм/Em 530 нм). Для оценки индуцируемой окислительной активности клетки инкубировали в питательной среде с форбол-12-миристан-13-ацетатом (ФМА) (Sigma-Aldrich, США) следующим образом: ФМА добавляли в концентрации 100 нМ в течение 15 мин, промывали свежим сбалансированным солевым раствором Хэнкса и затем инкубировали в растворе Хэнкса с DCFHDA (40 мКс) в течение 15 мин в CO₂-инкубаторе. Для оценки спонтанной окислительной активности клетки инкубировали в растворе Хэнкса без ФМА в течение 15 мин, затем промывали свежим раствором Хэнкса и инкубировали с 40 мКс DCFHDA в течение 15 мин. После окрашивания клетки трижды промывали раствором Хэнкса и анализировали флуоресценцию клеток с помощью проточного цитометра BD Accuri C6 (BD Bioscience, США).

Статистическая обработка. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 6.0. Для обработки непараметрических данных использовали U-критерий Манна–Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Биохимическое исследование. Анализ наиболее эффективного способа введения кондиционированной среды животным проводили на первом этапе исследования. Его результаты оценивали по уровню в крови цитолитического фермента аспаратаминотрансферазы, высвобождающегося из разрушенных гепатоцитов под действием токсических продуктов АЦ (рис. 1).

Через 4 ч после начала воздействия АЦ наименее эффективным способом является внутрибрюшинное введение препарата (уровень цитолитического фермента снижается на 19% по сравнению с контролем), а при пероральном и подкожном введении – на 46 и 75% соответственно (рис. 1). Поэтому дальнейшие эксперименты включали подкожное введение АЦ.

Подкожное введение суммарной фракции КС вызывало достоверное снижение уровня цитолитического фермента по сравнению с контролем: на 75% в первые 4 ч и на 50% в первые 24 ч (рис. 2; левые столбцы – контроль; средние «Об. фракция» – общая фракция КС МСК; правые – фракция КС МСК, содержащая белки с массой <30 кДа).

Подкожное введение фракции <30 кДа приводило к максимально значимому снижению уровня аспаратаминотрансферазы в крови в начале

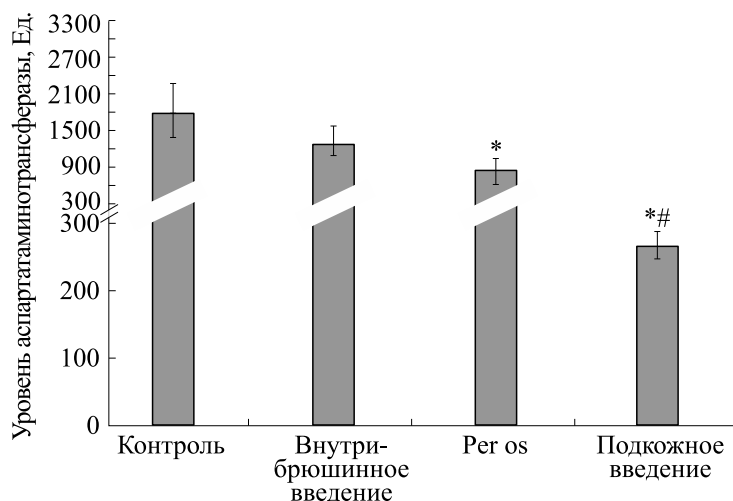


Рис. 1. Влияние метода введения паракринных факторов КС МСК на уровень аспаратаминотрансферазы в крови через 4 ч после введения АЦ; * – различия достоверны при сравнении с контрольной группой, # – различия достоверны при сравнении с другими группами.

острого периода после введения АЦ (85% по сравнению с контролем).

Экспрессия генов. Ингибирование пролиферации гепатоцитов под действием паракринных факторов является одной из возможных причин снижения деструкции печеночной паренхимы в острой фазе недостаточности, вызванной введением КС МСК. В связи с этим были исследованы вызванные КС изменения экспрессии маркера пролиферативной активности белка Ki-67 в тканях печени.

Введение КС (как общей фракции, так и фракции <30 кДа), полученных при культивировании МСК, вызывало резкое снижение экспрессии Ki-67 в первые двое суток (рис. 3; левые столбцы – контроль; средние «Об. фракция» – общая фракция КС МСК; правые – фракция КС МСК, со-

держащая белки с массой <30 кДа). В более поздние сроки (вторые и четвертые сутки) уровень экспрессии Ki-67 повышался более чем в два раза по сравнению с контролем.

Гистология. В контрольной группе максимальный уровень деструкции паренхимы печени наблюдался через 4 ч после введения культуральной среды (контроль) (рис. 4). Портальные вены в тканях контрольного животного полнокровны, обширные полнокровные центрлобулярные зоны печеночных долек слиты. Площадь некроза гепатоцитов колебалась от 35 до 50%. После введения КС зона полнокровия вокруг портальных вен значительно уменьшалась по сравнению с контролем. После введения фракции <30 кДа полнокровные портальные вены не обнаруживались. Площадь зон центрлобулярного полно-

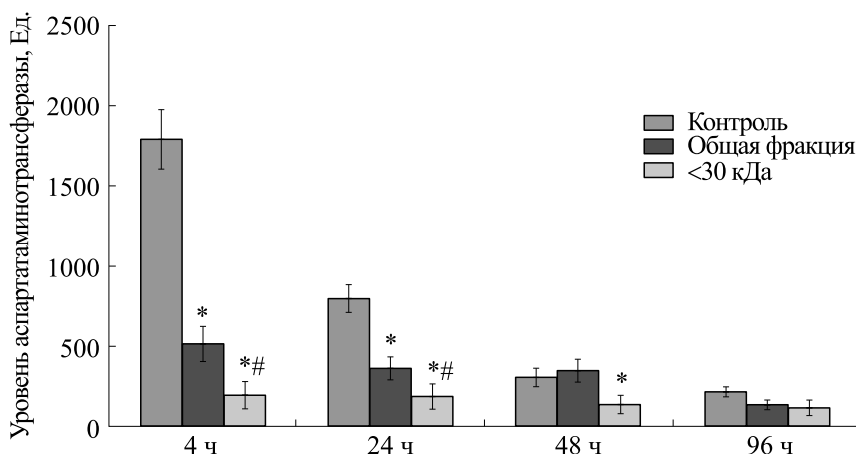


Рис. 2. Динамика влияния КС МСК на уровень аспаратаминотрансферазы в крови на фоне введения АЦ; * – достоверно по отношению к контрольной группе; # – различия достоверны при сравнении с другими группами.

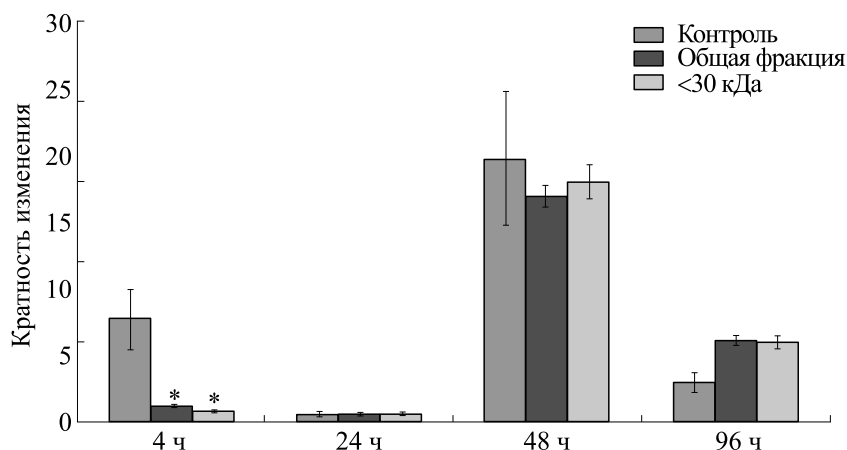


Рис. 3. Влияние КС МСК на уровень экспрессии Ki-67 в ткани печени.

кровя была минимальной по сравнению с таковой после введения тотальной фракции.

Так, введение суммарной фракции кондиционированной среды, полученной при культивировании МСК, через четыре часа после воздействия

АЦ вызвало достоверное уменьшение площади деструкции; использование фракции <30 кДа оказывало максимальный протективный эффект.

Гистологический анализ, проведенный через 24 ч после воздействия АЦ, показал:

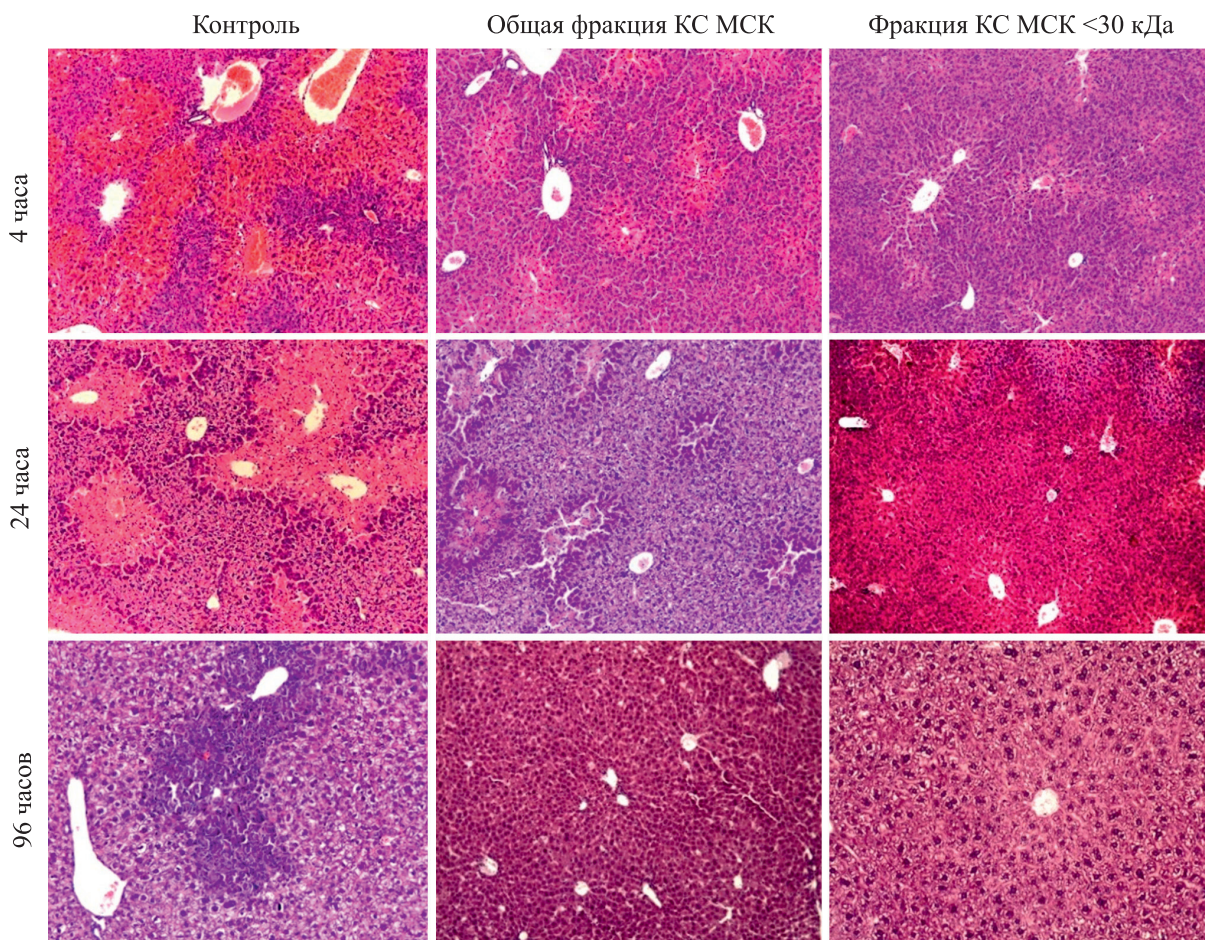


Рис. 4. Гистология печени: динамика влияния КС МСК на фоне введения АЦ. Окрашивание гематоксилином и эозином.

Таблица 1. Анализ морфологических изменений ткани печени при введении КС на фоне АЦ

Время	Изменения	Контроль	Общая фракция КС	КС <30 кДа
4 ч	Полнокровие портальных вен	2.85 ± 0.11	1.75 ± 0.21*	0.40 ± 0.11*#
	Центролобулярное полнокровие	2.65 ± 0.12	1.82 ± 0.31*	0.67 ± 0.21*#
	Дегенерация гепатоцитов	2.74 ± 0.23	0.81 ± 0.22*	0.54 ± 0.11*
24 ч	Дегенерация гепатоцитов	2.66 ± 0.22	1.30 ± 0.13*	1.45 ± 0.12*
	Центролобулярный некроз	2.60 ± 0.16	1.45 ± 0.21*	0.30 ± 0.12*#
	Регенерация гепатоцитов	0.70 ± 0.21	2.01 ± 0.10*	2.67 ± 0.22*#
96 ч	Воспалительная инфильтрация	2.56 ± 0.31	0.41 ± 0.11*	0.44 ± 0.13*
	Дегенерация гепатоцитов	2.51 ± 0.31	0.81 ± 0.14*	1.20 ± 0.08*
	Регенерация гепатоцитов	0.20 ± 0.08	1.82 ± 0.23*	2.67 ± 0.16*#

Примечание. Представлены средние значения ± стандартные отклонения; * – различия достоверны при сравнении с контрольной группой, # – различия достоверны при сравнении с другими группами.

– в контрольной группе: обширные, соединенные между собой зоны некроза гепатоцитов в центролобулярных зонах и узкая полоса регенерирующих гепатоцитов (характеризующаяся более интенсивным окрашиванием цитоплазматических клеток) в пограничных областях некроза;

– в опытной группе животных, которым вводили общую фракцию КС МСК: очаги центролобулярного некроза имеют минимальные размеры и встречаются в отдельных долях.

– в опытной группе животных, которым вводили фракцию КС МСК <30 кДа: в центролобулярных зонах долей печени некрозов не наблюдалось, тем не менее эти зоны были умеренно полнокровными.

Гистологический анализ, проведенный через четверо суток после введения АЦ и культуральной среды, показал, что в контрольной группе зоны центролобулярного некроза сменялись обширной воспалительной инфильтрацией, а в других отделах долей печени можно было наблюдать дистрофические изменения гепатоцитов.

В отличие от контрольной группы, в печени животных, которым вводили общую фракцию КС, не наблюдалось воспалительных инфильтратов на всей площади печеночных долей, включая центролобулярную зону. Введение белковой фракции <30 кДа также не вызывало некротических изменений в центролобулярной зоне. В то же время можно было наблюдать многочисленные регенерирующие гепатоциты.

Морфометрический анализ (табл. 1) выявленных изменений показал, что введение белковой фракции <30 кДа снижает уровень повреждения гепатоцитов и выраженность воспалительной ре-

акции, способствует более ранним процессам регенерации.

Отдельно исследовано влияние КС на рост соединительной ткани в отдаленные сроки после токсического действия АЦ.

Так, в контрольной группе (рис. 5) на десятые сутки после воздействия в перипортальной зоне вокруг воротной вены на фоне жировой дистрофии гепатоцитов отмечается нарушение лучевого строения долек (окраска по Пикро–Маллори). Дополнительное окрашивание по Ван-Гизону также выявило нарушение балочной структуры в перипортальной области и прилежащие гепатоциты в состоянии жировой дистрофии. Склеротизованная перипортальная строма сохранила воспалительную инфильтрацию (окраска по Ван Гизону).

Введение общей фракции КС приводило к появлению признаков незначительных склеротических изменений в портальной строме, содержащей одиночные лимфоциты, что подтверждалось окрашиванием по Ван Гизону.

Следует отметить, что минимальный рост соединительной ткани наблюдался при введении кондиционированной среды и особенно ее фракции <30 кДа.

Анализ экспрессии генов. Анализ экспрессии генов показал, что фракция КС <30 кДа индуцирует измененную активность генов с провоспалительными и противовоспалительными эффектами. Данные табл. 2 показывают, что КС вызывает значительное повышение уровня гена, ответственного за синтез тиоредоксина. Повышение экспрессии этого фермента на фоне воздействия АЦ через 24 ч после введения КС сопровождалось

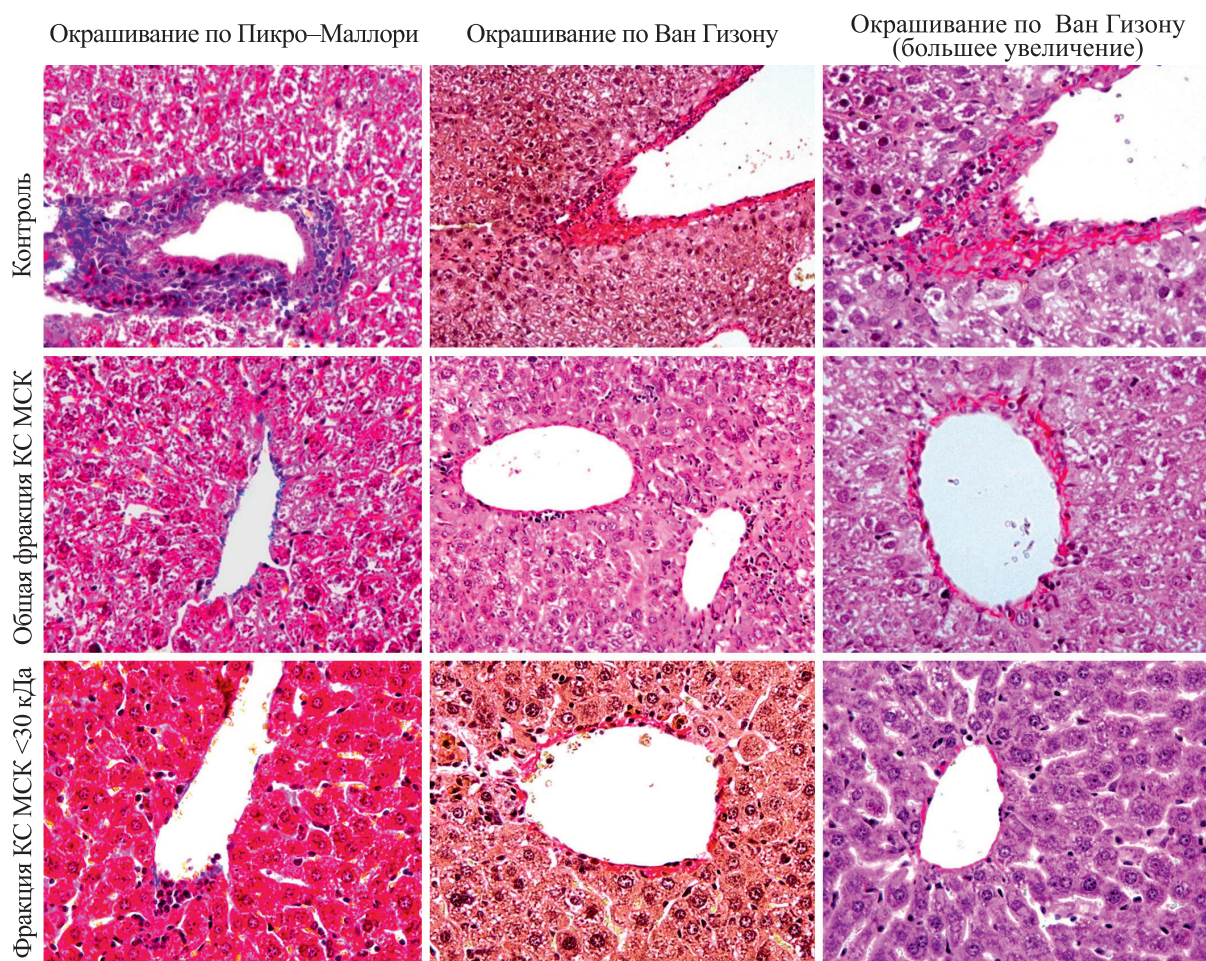


Рис. 5. Влияние КС МСК на рост соединительной ткани в отдаленные сроки после воздействия АЦ.

снижением экспрессии ИЛ-6, обладающего провоспалительной активностью, но повышением экспрессии провоспалительного цитокина (макрофаг-ингибирующего фактора – МИФ).

Продукция активных форм кислорода в нейтрофилах. Продукция АФК является одной из основ-

ных функций нейтрофилов, на которой основан их антибактериальный эффект.

Исследование показало, что через 4 ч после воздействия АЦ уровень спонтанной продукции АФК был таким же, как и в интактном контроле. Достоверные различия с группой интактных жи-

Таблица 2. Изменение уровня экспрессии генов после введения фракции КС МСК<30 кДа на фоне АЦ

Ген	Уровни экспрессии генов по отношению к контрольным значениям			
	4 ч	24 ч	48 ч	96 ч
МИФ	1.3 ± 0.7	3.2 ± 1.0*	1.1 ± 1.0	0.9 ± 0.4
Галектин	1.1 ± 0.4	1.4 ± 1.3	0.60 ± 0.55	1.4 ± 1.3
Каспаза 3	1.1 ± 0.3	1.4 ± 0.5	0.8 ± 0.6	1.1 ± 0.5
ИЛ6	0.6 ± 0.5	0.3 ± 0.2*	0.8 ± 0.4	0.8 ± 0.2
Тиоредоксин	1.4 ± 0.7	1.7 ± 0.3*	1.3 ± 0.5	0.6 ± 0.2

Примечание. Представлены средние значения ± стандартные отклонения; * – различия достоверны при сравнении с контрольной группой, # – различия достоверны при сравнении с другими группами.

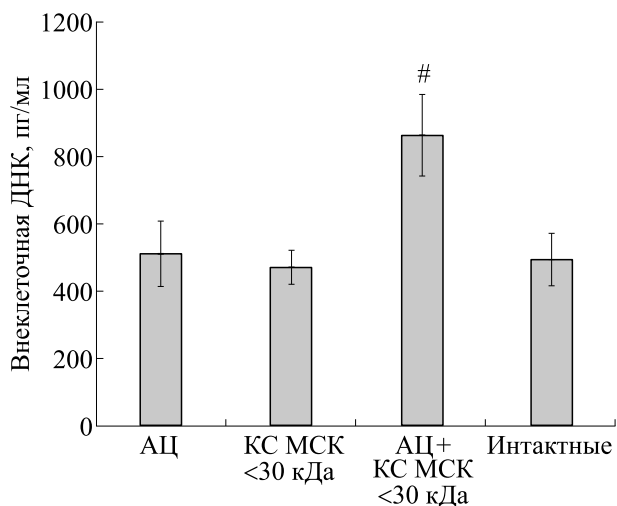


Рис. 6. Влияние КС МСК на спонтанную продукцию АФК в нейтрофилах. По оси ординат – средняя интенсивность флуоресценции клеток (усл. ед.), загруженных DCFHDA; # – различия достоверны при сравнении с другими группами ($p < 0.05$).

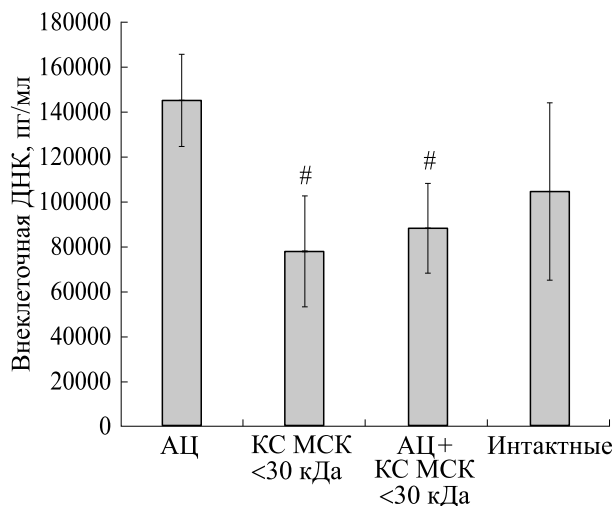


Рис. 7. Влияние КС МСК на ФМА-индуцированную продукцию АФК в нейтрофилах. По оси ординат – средняя интенсивность флуоресценции клеток (усл. ед.), загруженных DCFHDA; # – различия достоверны при сравнении с группой АЦ ($p < 0.05$).

вотных, которым вводили только фракцию КС МСК <30 кДа, также не наблюдались. Однако в группе животных, которым на фоне АЦ вводили фракцию КС МСК <30 кДа, наблюдалось достоверное увеличение спонтанной продукции АФК в нейтрофилах (рис. 6).

Следует отметить, что анализ ФМА-индуцированной продукции АФК в нейтрофилах показал противоположные результаты (рис. 7).

Показатель индуцированной продукции АФК в периферической крови животных, подвергшихся воздействию паракринных факторов КС на фоне АЦ, был достоверно ниже, чем у животных, подвергшихся воздействию АЦ. В то же время паракринные факторы не оказывали существенного влияния на продукцию АФК по сравнению с интактным контролем.

Уровень свободной внеклеточной ДНК. Исследование показало, что уровень внеклеточной ДНК в плазме крови мышей, которым вводили АЦ, достоверно повышался более чем в 30 раз (рис. 8) по сравнению с интактным контролем.

В то же время уровень внеклеточной ДНК в плазме животных, которым вводили фракцию КС МСК <30 кДа на фоне АЦ, был достоверно в три с половиной раза ниже уровня, который наблюдался у животных, получивших только АЦ. Уровень внеклеточной ДНК у животных, которым вводили только КС фракцию <30 кДа, был таким же, как и в контроле.

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, исследование показало, что КСа, полученная при культивировании МСК в условиях гипоксии (10% O_2), снижает уровень АЦ-ассоциированной деструкции печеночной ткани. Наиболее примечательным выводом из анализа печеночной ткани экспериментальных животных является уменьшение выраженности гранулоцитарной инфильтрации, которая может прямо коррелировать со степенью некроза паренхимы печени, подтвержденной уровнем цитолитического фермента [10]. В поздних наблюдениях

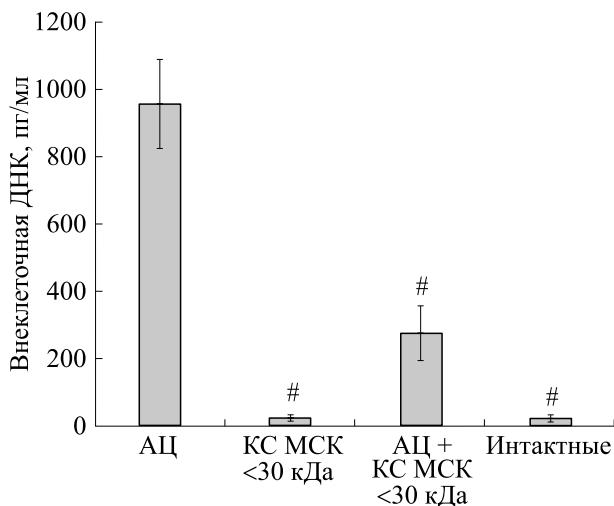


Рис. 8. Влияние КС МСК на уровень внеклеточной ДНК в плазме крови животных на фоне АЦ.

этот эффект достигался уменьшением объема формируемой фиброзной ткани. Это могло быть обусловлено как подавлением пролиферации фибробластов пептидами КС, так и уменьшением выраженности начального воспалительного повреждения паренхимы.

В то же время исследование показало, что КС (особенно его фракция <30 кДа) может по-разному влиять на продукцию АФК в нейтрофилах: усиливает спонтанную продукцию АФК и ингибирует продукцию АФК, индуцированную ФМА.

Наблюдаемый эффект может быть обусловлен следующими фактами: спонтанная продукция АФК в нейтрофилах реализуется за счет уже активированного NOX2, присутствующего в клеточной мембране и паракринные факторы могут воздействовать непосредственно на уже функционирующий комплекс.

В то же время ФМА-индуцированная продукция АФК требует поэтапной активации промежуточных ферментов, в частности протеинкиназы С, и ее ингибирование паракринными факторами может влиять на процесс сборки оксидазного комплекса, что в свою очередь приведет к снижению продукции АФК.

Галектин 1 и тиоредоксин, факторы, присутствующие при КС, также могут влиять на NOX2. В наших предыдущих исследованиях было показано, что условия культивирования существенно влияют на продукцию этих паракринных факторов в стволовых клетках [15]. В условиях гипоксии ($O_2 < 10\%$) значительно усиливалась продукция именно галектина 1 и тиоредоксина, т.е. факторов, способных изменять продукцию АФК.

Галектин 1 является провоспалительным пептидом, который может взаимодействовать с клеточной мембраной нейтрофилов, активируя NOX2, при условии, что клетки были активированы процессом экстравазации тканей [20, 21].

Активация спонтанной продукции АФК в нейтрофилах под действием КС (фракция <30 кДа) будет способствовать регенерации печеночной ткани после воздействия АЦ, так как известно, что молекулы АФК, секретлируемые нейтрофилами, могут способствовать как развитию макрофагов, так и процессам регенерации печени после токсического действия АЦ [14]. Следовательно, увеличение спонтанной продукции нейтрофилов под действием фракции КС <30 кДа, продемонстрированное в исследовании, будет способствовать более быстрому восстановлению гепатоцитов, показанному в предыдущей работе [16].

Подавление индуцированной продукции АФК также могло иметь положительный эффект, поскольку было показано, что гиперпродукция АФК на фоне АЦ с последующей дегрануляцией и высвобождением нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET) вызывает прогрессирование печеночной недостаточности [22, 23].

Снижение продукции АФК в индуцированных клетках могло быть вызвано изменением активности протеинкиназы С. Ряд авторов показали, что стимуляция и активация нейтрофилов формбол-12-миристан-13-ацетатом приводит к образованию NET. Образование NET после стимуляции ФМА зависит от продукции АФК (через систему NOX2). Однако было показано, что протеинкиназа С и особенно ее изоформа ПКС β , участвующие в сборке NOX2, наиболее важны для образования NET [24].

Таким образом, возможно, что паракринные факторы, активируя спонтанную активность NOX2 и ингибируя активность протеинкиназы С, могут ингибировать продукцию АФК, дегрануляцию нейтрофилов и образование NET при клеточной активации и тем самым снижать уровень гепатоцеллюлярной недостаточности. Косвенно это предположение может быть подтверждено данными, показавшими достоверное снижение уровня внеклеточной ДНК относительно АЦ при введении КС.

Следует отметить, что вопрос об участии протеинкиназы С в патогенезе ацетаминофен-индуцированного воспаления печени является актуальным. Например, показано, что при АЦ протеинкиназа С участвует в гепатотоксичности, а применение ингибиторов протеинкиназы С эффективно (до 80%) в снижении некроза гепатоцитов, вызванного АФК [25, 26].

Также гепатопротективным эффектом может обладать тиоредоксин – еще один фактор КС. По литературным данным передозировка АЦ, вызывающая избыточную продукцию АФК, приводит к снижению эндогенной экспрессии тиоредоксина и активации сигнального пути JNK. Таким образом, введение экзогенного тиоредоксина в составе КС может значительно снижать уровень гепатоцеллюлярной недостаточности, о чем свидетельствуют ранее полученные экспериментальные данные [27].

Анализ экспрессии генов показал, что использование КС МСК (фракция <30 кДа) значительно увеличивает экспрессию МИФ и тиоредоксина в ткани печени. Распространено мнение, что МИФ является провоспалительным цитокином, уровень которого повышается при тканевой недоста-

точности и системных заболеваниях [28]. В то же время известно, что уровень экспрессии МИФ и тиоредоксина повышается практически при всех состояниях, связанных с окислительно-восстановительными процессами, которые следуют за стрессом, травмой, дегенерацией, воспалением и гибелью клеток [29–31]. Таким образом, результаты исследования показывают, что при введении КС повышенная спонтанная продукция АФК в нейтрофилах может вызывать повышение уровня МИФ и тиоредоксина в тканях печени относительно контроля.

Пока неясно, почему эффекты перорального и подкожного введения КС МСК сопоставимы. Одной из возможных причин является влияние АЦ на Р-белок кишечника. Литературные данные не содержат сведений о влиянии АЦ на всасывание коротких белковых молекул в кишечнике. Однако ингибирование Р-белка АЦ и усиление всасывания ксенобиотиков в портальную систему печени [32] не позволяет исключить всасывание сигнальных белков через слизистую оболочку кишечника и их прямое проникновение в ткань печени.

ВЫВОДЫ

Полученные данные позволяют сделать следующие выводы:

1. Фракция КС <30 кДа оказывала максимальный протективный эффект на печень при введении АЦ.
2. Белки этой фракции снижают выраженность системной воспалительной реакции и степень фиброза ткани печени в отдаленные сроки после введения токсина.
3. Степень выраженности гранулоцитарной инфильтрации коррелирует со степенью некроза печеночной паренхимы (что подтверждается уровнем цитолитических ферментов).
4. Фракция КС <30 кДа увеличивает спонтанную и уменьшает индуцированную внутриклеточную продукцию АФК.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с экспериментальными животными проведены в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в научных исследованиях (1986, 86/609/ЕЕС).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. M. Larson, *Clin. Liver Dis.*, **11**, 525 (2007).
2. M. R. McGill, M. R. Sharpe, C. D. Williams, et al., *J. Clin. Invest.*, **122**, 1574 (2012).
3. H. Jaeschke, C. D. Williams, A. Ramachandran, et al., *Liver Int.*, **32**, 8 (2012).
4. Y. Ishida, T. Kondo, A. Kimura, et al., *Eur. J. Immunol.*, **36**, 1028 (2006).
5. Z. X. Liu, D. Han, B. Gunawan, et al., *Hepatology*, **43**, 1220 (2006).
6. P. E. Marques, S. S. Amaral, D. A. Pires, et al., *Hepatology*, **56**, 1971 (2012).
7. C. Cover, J. Liu, A. Farhood, et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **216**, 98 (2006).
8. H. S. Hou, C. L. Liao, H. K. Sytwu, et al., *PLoS One*, **7**, e44880 (2012).
9. J. A. Lawson, A. Farhood, R. D. Hopper, et al., *Toxicol. Sci.*, **54**, 509 (2000).
10. C. D. Williams, M. L. Bajt, A. Farhood, et al., *Liver Int.*, **30**, 1280 (2010).
11. C. D. Williams, M. L. Bajt, M. R. Sharpe, et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **275** (2), 122 (2014).
12. C. D. Williams, A. Farhood, and H. Jaeschke, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **247**, 169 (2010).
13. J. X. Wang, C. Zhang, L. Fu, et al., *Toxicol. Lett.*, **265**, 38 (2017).
14. W. Yang, Y. Tao, Y. Wu, et al., *Nat. Commun.*, **10** (1), 1076 (2019).
15. A. Temnov, K. Rogov, V. Zhalimov, et al., *Hepat. Med.*, **11**, 89 (2019).
16. A. A. Temnov, K. A. Rogov, A. N. Sklifas, et al., *Mol. Biol. Rep.*, **46** (3), 3101 (2019).
17. H. Yagi, A. Soto-Gutierrez, N. Navarro-Alvarez, et al., *Mol. Therapy*, **18** (10), 1857 (2010).
18. F. A. von Meijenfeldt, L. C. Burlage, S. Bos, et al., *Liver Transpl.*, **24** (12), 1716 (2018).
19. T. D. Schmittgen and K. J. Livak, *Nat. Protoc.*, **3** (6), 1101 (2008).
20. J. Almkvist, C. Dahlgren, H. Leffler, et al., *J. Immunol.*, **168** (8), 4034 (2002).
21. M. T. Elola, M. E. Chiesa, and N. E. Fink, *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, **141** (1), 23 (2005).
22. J. Liu, M. Jiang, Q. Jin et al., *Front. Pharmacol.*, **12**, 723881 (2021).
23. F. A. von Meijenfeldt, R. T. Stravitz, J. Zhang, et al. *Hepatology*, **75** (3), 623 (2022).
24. R. D. Gray, C. D. Lucas, A. MacKellar, et al., *J. Inflamm. (Lond.)*, **10** (1), 12 (2013).
25. B. Saberi, M. Shinohara, M. D. Ybanez, et al., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **295** (1), C50 (2008).
26. B. Saberi, M. D. Ybanez, H. S. Johnson, et al., *Hepatology*, **59** (4), 1543 (2014).
27. B. W. Lee, B. S. Jeon, and B. I. Yoon, *J. Appl. Toxicol.*, **38** (7), 1008 (2018).
28. T. Shimizu, R. Abe, H. Nakamura, et al., *Biochem Biophys Res Commun.*, **264** (3), 751 (1999).

29. A. Kudrin and D. Ray, *Immunol. Cell Biol.*, **86** (3), 232 (2008).
30. H. Lue, R. Kleemann, T. Calandra, et al., *Microbes Infect.*, **4**, 449 (2002).
31. J. Yodoi, H. Nakamura, and H. Masutani, *Biol. Chem.*, **383**, 585 (2002).
32. A. Novak, G. D. Carpini, M. L. Ruiz, et al., *J. Pharm. Sci.*, **102** (10), 3830 (2013).

Paracrine Effects of Stem Cell Conditioned Medium on Production of Oxygen Reactive Species in Blood Neutrophils in Acetaminophen-Induced Liver Failure

A.A. Temnov*, **, A.N. Sklifas*, V.K. Zhalimov*, M.G. Sharapov*, R.S. Fadeev***, M.I. Kobyakova***, N.I. Kukushkin*, and **K.A. Rogov******

**Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***Moscow Institute of Physics and Technology, Institutskii per. 9, Dolgoprudny, Moscow Region, 141701 Russia*

****Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

*****Research Institute of Human Morphology, Petrovsky National Research Center of Surgery, ul Tsurupy 3, Moscow, 117418 Russia*

The current study examined the effects of mesenchymal stem cells-derived conditioned medium on the severity of systemic inflammatory response induced by the administration of acetaminophen, as well as its long-term effects on hepatic tissues. A conditioned medium fraction <30 kDa showed maximum protective effect. Proteins of this fraction reduce the degree of systemic inflammatory response and liver tissue fibrosis long after the toxin administration. Liver tissues from experimental animals were examined, and a correlation between the reduction of granulocytic infiltration scoring and the degree hepatic parenchymal necrosis was demonstrated (confirmed by the cytolytic enzyme level). The <30 kDa fraction increased the spontaneous but decreased phorbol-12-myristate-13-acetate-induced intracellular production of reactive oxygen species. Results from this study show that the level of macrophage migration inhibitory factor and expression of thioredoxin significantly increase as compared to controls during increased spontaneous production of reactive oxygen species in neutrophils.

Keywords: acetaminophen, liver, fibrosis, stem cells, conditioned media