

О. А. Куделич¹, Г. Г. Кондратенко¹, М. П. Потарнев²

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ЛЕЧЕНИИ ОСТРОГО ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПАНКРЕАТИТА

УО «Белорусский государственный медицинский университет»¹
ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии
и медицинских биотехнологий»²

Острый панкреатит является одним из наиболее жизнеугрожающих urgentных хирургических заболеваний. Основным патогенетическим фактором, обуславливающим развитие полиорганной недостаточности при тяжелом остром панкреатите, является эндогенная интоксикация, что придает особое значение поиску новых методов ее коррекции. Представленный анализ данных литературы свидетельствуют о том, что разработка эффективных методов клеточной трансплантации в настоящее время находится в центре внимания экспериментальных исследований. Применение мезенхимальных стромальных клеток при воспалительных процессах является новым направлением регенеративной медицины. Терапия острого панкреатита, основанная на применении мезенхимальных стромальных клеток различного происхождения, проявляет в эксперименте убедительное противовоспалительное и антиапоптотическое действие.

Ключевые слова: острый панкреатит, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, микровезикулы, клеточная терапия.

O. A. Kudelich, G. G. Kondratenko, M. P. Potarnev

STEM CELL TECHNOLOGIES IN THE TREATMENT OF ACUTE EXPERIMENTAL PANCREATITIS

Acute pancreatitis is one of the most life-threatening urgent surgical diseases. Endogenous intoxication is the main pathogenetic factor causing multiple organ failure in severe acute pancreatitis, which attaches particular importance to the search for new methods of its correction. The presented analysis of the literature data indicates that the development of effective methods of cell transplantation is currently in the focus of experimental research. The use of mesenchymal stromal cells in inflammatory processes is a new direction of regenerative medicine. Therapy of acute pancreatitis, based on the use of mesenchymal stromal cells of various origins, shows a convincing anti-inflammatory and anti-apoptotic effect in the experiment.

Key words: acute pancreatitis, mesenchymal stromal cells, microvesicles, cell therapy.

Лечение острого панкреатита (ОП) остается наиболее сложной проблемой для хирургов и специалистов интенсивной терапии [13]. Большинство пациентов (75–85%) независимо от этиологии страдают отечной формой, которая не представляет сложности ни в диагностическом, ни в лечебном отношении [60]. Отечная форма ОП характеризуется абортивным течением и разрешается на протяжении 48–72 часов под воздействием комплексной консервативной терапии. Однако в 15–20% наблюдений развитие ОП

отличается тяжелым течением, а изменения в тканях поджелудочной железы (ПЖ) носят деструктивный характер [5, 13]. При этой форме ОП быстро развивается выраженная эндогенная интоксикация, а средствами прижизненной визуализации выявляется дезорганизация структуры поджелудочной железы. Лавинообразное освобождение молекулярных фрагментов, ассоциированных с повреждением, (DAMPs) и провоспалительных цитокинов проявляется синдромом системного воспалительного ответа (ССВО) с последующей

дисфункцией различных органов и полиорганной недостаточностью (ПОН) в ближайшие сутки от начала заболевания [3, 7, 48].

Патофизиология ОП включает активацию и высвобождение панкреатических ферментов в интерстициальное пространство, самопереваривание ПЖ и ПОН после высвобождения в периферическую кровь активированных панкреатических ферментов и медиаторов воспаления. Показано, что в начальной фазе заболевания происходит интраацинарная активация трипсиногена с переходом его в трипсин с последующей активацией других ферментов [55]. Воздействие протеолитических ферментов на стенку кровеносных сосудов приводят к эндотелиальной дисфункции, что сопровождается активацией свертывающей, противосвертывающей и калликреин-кининовой систем. В результате сначала развивается спазм, потом парез сосудов микроциркуляции, приводящие к сладж-феномену, а затем к нарушению проходимости микроциркуляторного русла, отёку и ишемии ткани ПЖ [49]. Нарастающая эндогенная интоксикация связана с накоплением в периферической крови недоокисленных продуктов клеточного метаболизма (лактата и пирувата). Кроме активации панкреатических ферментов в ПЖ и их попадания в кровоток, при ОП в течение минут начинается инфильтрация ПЖ иммунными клетками, включая макрофаги, нейтрофилы, дендритные, тучные клетки, естественные киллерные (ЕК) клетки, а также Т- и В-лимфоциты [47, 48]. Их мобилизация и активация в очаге воспаления в ПЖ, сопровождается накоплением (местно и в кровотоке) интерлейкина-1 β (ИЛ-1 β), интерлейкина-6 (ИЛ-6), интерлейкина-8 (ИЛ-8), фактора активации тромбоцитов (PAF), фактора некроза опухоли- α (ФНО- α). Активация клеток иммунной системы происходит с участием транскрипционного фактора $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) [55]. При этом для активированных нейтрофилов и макрофагов характерны избыточная продукция активных форм кислорода (АФК), угнетение антиоксидантной системы (АОС), окислительный стресс. Это приводит к усилению перекисного окисления липидов (ПОЛ),

вызывающему повреждение биологических мембран клеток, изменение мембранного потенциала митохондрий, истощение запасов аденозинтрифосфата и некротической гибели клеток [45]. Генерализация воспалительного процесса при ОП сопряжена с выбросом цитокинов и других биологически активных веществ, инициирующих и поддерживающих воспаление, что позволяет рассматривать их для мониторинга ОП и создания новых подходов и методов лечения.

Применение мезенхимальных стромальных клеток (МСК) при воспалительных процессах является новым направлением регенеративной медицины. МСК выявлены в костном мозге, жировой ткани, во многих органах и тканях, включая скелетные мышцы, печень и поджелудочную железу [10, 18]. МСК характеризуются высоким пролиферативным потенциалом, способностью к самообновлению, а также дифференцировкой в остеобласты, хондроциты и адипоциты [1]. При определенных условиях МСК способны также к трансдифференцировке в клетки эктодермального и энтодермального происхождения, включая эндотелиальные и нейральные клетки, кардиомиоциты, гепатоциты [11]. Клиническая эффективность клеточной терапии с использованием МСК является в настоящее время предметом активного обсуждения [72]. Способность оказывать иммуномодулирующее, противовоспалительное, антиапоптотическое действие, дифференцироваться в клетки различных тканей делают МСК потенциально эффективным инструментом для лечения различных патологий, включая ОП [25, 31, 41].

Цель работы – на основании анализа данных литературы оценить возможности и перспективы клеточной терапии при остром панкреатите.

В качестве метода исследования осуществлен поиск и отбор систематических обзоров и оригинальных статей, опубликованных между 2002 и 2021 годами. Для идентификации необходимых источников использовались следующие ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки, мезенхимальные стволовые клетки, микровезикулы, терапия остро-

го панкреатита и стволовые клетки. Поиск проведен с помощью систем и электронных баз данных «PubMed», «eLIBRARY», «cyberlenika», ClinicalTrials.gov.

В результате анализа вышеперечисленных баз данных нами не было найдено публикаций по клиническому использованию МСК при лечении пациентов с ОП. Выявлено 178 публикаций, включающих ключевые слова, после изучения аннотаций было исключено 110 источников, не связанных

с целью нашего исследования. Из оставшихся 68 публикаций, 15 были посвящены клеточной терапии хронического панкреатита, а после исключения в определенной степени дублирующих обзорных статей, оригинальными полнотекстовыми оказались 24 публикации, в которых эффективность клеточной терапии была изучена при ОП на экспериментальных животных. Основные данные этих исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1. Обзор исследований, посвященных клеточной терапии острого экспериментального панкреатита

Автор	Животное	Источник МСК	Доза МСК	Путь введения МСК	Время введения МСК	Полученный результат
Jung и др., 2011 [30]	Крыса	КМЧ	1×10 ⁶	В	-	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ амилазы и липазы • ↓ отека, некроза ПЖ • иммуномодулирующий эффект: ↓ ФНОα, ИЛ1, ИЛ6, ИЛ15, ИЛ17; ↑ ИЛ4, ИЛ10, экспрессия Foxp3 • миграция МСК в ПЖ
Tu и др., 2012 [58]	Крыса	КМК	1×10 ⁶	ХВ	-	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ амилазы и липазы • антиоксидантный эффект: ↓ МДА, ↑ СОД • иммуномодулирующий эффект: ↓ ФНОα, ИЛ6 • ↓ отека, некроза ПЖ, повреждения тонкой кишки
Meng и др., 2013 [42]	Крыса	ПЧ	1×10 ⁷ /кг	ХВ	12 часов	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ амилазы и липазы • иммуномодулирующий эффект: ↓ ФНОα, ИЛ1, ИЛ6; ↑ ИЛ4, ИЛ10 • ↓ отека, некроза ПЖ, антиапоптотический эффект
Yang и др., 2013 [61]	Крыса	ПЧ	5×10 ⁴ /кг 5×10 ⁵ /кг 5×10 ⁶ /кг 1×10 ⁷ /кг	ХВ	0, 1, 6 и 12 часов	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ амилазы • ↓ смертности, воспаления в ПЖ и легких • зависимость эффекта от дозы и времени введения МСК
Hua и др., 2014 [27]	Крыса	ПЧ	2×10 ⁶	ХВ	12 часов	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ амилазы и липазы крови • иммуномодулирующий эффект: ↓ ФНОα, ИЛ1, IFNγ; ↑ ИЛ4, ИЛ10 • ↓ отека, некроза ПЖ, стимуляция ангиогенеза в ПЖ
Jung и др., 2014 [29]	Крыса	КМЧ	1×10 ⁶	ХВ	24 часа	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ амилазы и липазы • антиоксидантный эффект: ↓ МДА, ↑ СОД • ↓ отека и некроза ПЖ, антиапоптотический эффект
Qian и др., 2015 [50]	Крыса	ПЧ	1×10 ⁷ /кг	ХВ	24	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ амилазы и липазы • иммуномодулирующий эффект: ↓ ФНОα, ИЛ1, ИЛ6, ИЛ15, ИЛ17; ↑ ИЛ4, ИЛ10 • стимуляция ангиогенеза и регенерации ПЖ • миграция МСК в ПЖ
Yin и др., 2016 [65]	Крыса	КМК (МВ)	1×10 ⁶	ХВ	3 часа	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ амилазы и липазы крови • иммуномодулирующий эффект: ↓ ФНОα, ИЛ1, ИЛ6 • уменьшение повреждения ПЖ за счет подавления фактора ядерной транскрипции NF-κB p65
He и др., 2016 [26]	Мышь	КМЧ	2×10 ⁶	ХВ	6 часов	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ амилазы и липазы крови • иммуномодулирующий эффект: ↓ ФНОα, ИЛ1; ↑ ИЛ4, ИЛ10 • антиоксидантный эффект: ↓ МДА, ↑ СОД • ↓ отека ПЖ, антиапоптотический эффект ПЖ • отсутствие миграции МСК в ПЖ

Автор	Животное	Источник МСК	Доза МСК	Путь введения МСК	Время введения МСК	Полученный результат
Kawakubo и др., 2016 [32]	Крыса	ПОК	1×10^6	ПВ	0 часов	• ↓ некроза ПЖ, антиапоптотический эффект
Kim и др., 2016 [33]	Крыса	ЖТС	1×10^7 /кг	ХВ	-	• ↓ амилазы и липазы • иммуномодулирующий эффект: ↓ ФНО α , ИЛ1, ИЛ12, ИЛ17; ↑ ИЛ4, ИЛ10 • ↓ отека, некроза ПЖ
Zhao и др., 2016 [71]	Крыса	КМК	$5-7 \times 10^7$	ХВ	24 часа	• ↓ летальности • ↓ отека и воспаления ПЖ • миграция МСК в ПЖ
Lu и др., 2017 [39]	Крыса	КМК	1×10^6	ХВ	0, 6, 12 часов	• ↓ амилазы и липазы • ↓ повреждения ПЖ и тонкой кишки за счет повышения уровня AQP1
Qian и др., 2017 [51]	Крыса	КМК	1×10^7 /кг	ХВ	24 часа	• ↓ амилазы и липазы • иммуномодулирующий эффект: ↓ ФНО α , ИЛ1, ИЛ6, HMGB1 ↓, MPO ↓, CD68, ↑ ИЛ4, ИЛ10, TGF- β • уменьшение повреждения ПЖ за счет подавления фактора ядерной транскрипции NF- κ B p65
Chen и др., 2017 [17]	Крыса	КМК	-	-	-	• ↓ отека и воспаления в ПЖ • ↓ повреждения почек за счет улучшения микроциркуляции путем ингибирования Rho-киназы
Song и др., 2019 [56]	Крыса	КМК	5×10^6 /кг	ХВ	12 часа	• ↓ амилазы и липазы • ↓ отека, некроза ПЖ • иммуномодулирующий эффект: ↓ ФНО α , ИЛ1, ИЛ6; ↑ ИЛ4, ИЛ10 • ↓ некроза ПЖ, антиапоптотический эффект
Lin и др., 2019 [36]	Крыса	КМК	1×10^6	БВ	0 часов	• ↓ амилазы • иммуномодулирующий эффект: ↓ ФНО α , ↑ ИЛ10 • снижение проницаемости гематоэнцефалитического барьера за счет ↓ апоптоза эндотелиальных клеток микрососудов головного мозга
Yang и др., 2019 [66]	Крыса	ПЧ	1×10^7	ХВ	12 часов	• ↓ некроза ПЖ, ↑ ангиогенеза в ПЖ
Dong и др., 2019 [22]	Крыса	КМК	1×10^6	ХВ/В		• ↓ отека и воспаления ПЖ • комбинированное введение внутрибрюшинно и в хвостовую вену оказывает более выраженный эффект
Li и др., 2019 [35]	Крыса	КМК	1×10^7 /кг	В	24 часа	• ↓ амилазы • иммуномодулирующий эффект: ↓ ангиопоэтина, ФНО α , ИЛ1, ИЛ6; ↑ ИЛ4, ИЛ10 • ↓ отека, некроза ПЖ за счет ↑ экспрессии miR-181a-5p и подавления TGF- β 1
Liu и др., 2020 [38]	Крыса	КМК	1×10^7 /кг	ХВ	12 часов	• антиапоптотический эффект ПЖ за счет стимуляции секреции эндотелиального фактора роста А и ангиогенеза
Sun и др., 2021 [54]	Крыса	ВФК	5×10^6	ХВ	24 часа	• ↓ амилазы • иммуномодулирующий эффект: ↓ ФНО α , ИЛ1, ИЛ6 • экспрессия маркеров клеток предшественников панкреатитов • улучшение регенерации ПЖ

Автор	Животное	Источник МСК	Доза МСК	Путь введения МСК	Время введения МСК	Полученный результат
Abdelhafez и др., 2021 [9]	Крыса	КМК	1×10 ⁶	ХВ	0 часов	• сочетание МСК и антиоксидантов улучшает регенерацию ПЖ и имеет лучший иммуномодулирующий эффект
Fukase и др., 2021 [24]	Мышь	КМЧ	1×10 ⁵	ЯВ	6 часов	• многолинейно дифференцирующиеся стрессоустойчивые клетки (Muse) показали лучший терапевтический эффект при лечении ОП в сравнении с другими стволовыми клетками

Примечание. КМК – костный мозг крысы, КМЧ – костный мозг человека, ПЧ – пуповина человека, МВ – микровезикулы, ПОК – плодная оболочка крысы, ВФК – волосяной фолликул крысы, ЖТС – жировая ткань собаки, ХВ – хвостовая вена, В – внутрибрюшинно, ПВ – половая вена, ЯВ – яремная вена, БВ – бедренная вена.

Моделирование острого экспериментального панкреатита

Во всех исследованиях для моделирования острого панкреатита использовались мелкие животные, наиболее часто крысы (22 исследования). В двух исследованиях индукцию легкого ОП проводили путем внутрибрюшинного введения церулеина в дозе 75 мкг/кг веса [30, 65]. Для воспроизведения тяжелого ОП с некрозом поджелудочной железы выполнялась перфузия билиопанкреатического протока 2–5% раствором таурохолат натрия [17, 22, 35, 36, 39, 51, 56, 66, 71]. Имеется информация (Tu и соавт., 2012) о моделировании ОП путем введения тиофенкарбоната натрия под капсулу поджелудочной железы [58]. При этом эффект от вводимых МСК не зависел от модели ОП на лабораторных животных.

Источник МСК, доза и путь введения

МСК впервые были выделены и охарактеризованы Friedenstein и соавт. в 1976 году. В 2006 году Международным обществом клеточной терапии были сформированы минимальные критерии для идентификации МСК, включающие адгезивность к пластику, экспрессию CD73, CD90 и CD105, отсутствие экспрессии маркеров гемопоэтических и эндотелиальных CD34, CD45, а также CD11b, CD14, CD19, CD79a, HLA-DR. Кроме того, МСК характеризуются способностью к индуцированной дифференцировке в клетки жировой, костной и хрящевой ткани *in vitro*.

Клеточная терапия острого панкреатита в эксперименте впервые была описана Jung и соавт. в 2011 году [30]. Согласно доступной нам литературы, в большинстве случаев источником МСК был костный мозг крысы и человека. В 5 публикациях МСК были выделены из пуповины человека [42, 61, 27, 50, 66], в 3 исследованиях МСК получены из плодной оболочка крысы [32], жировой ткани собаки [33] и волосяного фолликула крысы [54]. МСК, полученные из разных источников, имеют некоторые различия по фенотипу и функциональным характеристикам *in vitro*, но не представлено данных о различиях их эффективности при лечении ОП в эксперименте [25].

В экспериментах на грызунах при ОП использовались два пути введения МСК: внутривенный и внутрибрюшинный. Наиболее распространенными были внутривенные инъекции МСК в хвостовую вену или дорсальную вену полового члена, в 3-х исследованиях использовался внутрибрюшинный путь доставки клеток [22, 30, 35]. Dong и соавт. (2019) было установлено, что при совместном введении МСК (внутривенно и внутрибрюшинно) противовоспалительный эффект оказался более выражен, а некротические изменения в поджелудочной железе также были меньше, чем у крыс группы сравнения [22]. Имеются сведения о возможности введения МСК внутриартериально, внутримышечно или непосредственно изучаемый орган. Так в работе Amando и соавт. (2005) после моделирования инфаркта миокарда животным выполняли чрескожные внутрикардиальные инъекции

МСК [12]. Исследования Braid и соавт. (2018) показали, что время выживания МСК *in vivo* зависит от пути их введения. По их данным, внутримышечное введение приводило к более длительному выживанию клеток по сравнению с другими путями, такими как внутривенное, внутривентральное и подкожное введение. [14]. При анализе литературы не найдено сведений о внутриартериальном или внутримышечном путях доставки стволовых клеток при лечении экспериментального ОП.

Yang и соавт. (2013) оценили зависимость действия МСК пуповины человека от дозы и времени при лечении ОП у крыс, вызванного введением в панкреатический проток раствора таурохолата натрия [61]. Животным вводили одну из 4-х различных концентраций МСК: 5×10^4 /кг, 5×10^5 /кг, 5×10^6 /кг, 1×10^7 /кг. Установлено, что показатель смертности, уровень амилазы крови, ФНО- α , интерферона- γ были значительно ниже у крыс, получавших дозы МСК 5×10^5 /кг, 5×10^6 /кг, 1×10^7 /кг, по сравнению с контрольной группой. Однако не наблюдалось существенной разницы с контролем у крыс, получавших дозу МСК 5×10^4 /кг. Кроме того, не наблюдалось никакого дополнительного эффекта при увеличении дозы МСК с 5×10^5 /кг до 1×10^7 /кг. Для определения зависимости терапевтического эффекта МСК от времени, крысам внутривенно вводили 5×10^6 /кг МСК на 0, 1, 6 и 12 часов после индукции ОП. При патоморфологическом исследовании отек в поджелудочной железе был меньше в группах животных, получивших лечение в первые 6 часов от начала моделирования ОП [61].

Влияние МСК на уровень амилазы и липазы крови

Одним из важных клинико-лабораторных тестов оценки течения ОП является определение и количественная оценка в плазме крови панкреатических ферментов – амилазы и липазы [13]. У пациентов с ОП на высоте воспаления активность этих ферментов возрастает в связи с «уклонением» их в кровь. При моделировании ОП установлено, что уровни амилазы и липазы значительно повышались у животных по сравнению с контролем,

а введение МСК значительно снижало уровни обоих ферментов в периферической крови этих животных (таблица 1).

Антиоксидантный эффект МСК

Как известно, при ОП вследствие нарушения микроциркуляции в тканях накапливаются продукты незавершенного метаболизма, нарастают ацидоз и гипоксия, повышается концентрация протеолитических и липолитических ферментов, вазоактивных веществ и продуктов их обмена. Разобщение дыхательных цепей митохондрий и неполное восстановление кислорода, растворенного в липидном матриксе, приводит к образованию супероксидных, перекисных и гидроперекисных радикалов, которые запускают процесс ПОЛ, нарушающего структуры клеточных мембран [4, 7, 55]. Регуляция интенсивности ПОЛ на различных уровнях осуществляется антиоксидантными системами, срыв которых приводит к лавинообразному накоплению токсических промежуточных и конечных продуктов перекисидации. Продукты ПОЛ, в том числе и малоновый диальдегид (МДА) – один из маркеров активности этого процесса, являются высокотоксичными для клеток организма.

Антиоксидантный эффект МСК был изучен в 4-х исследованиях [9, 26, 29, 58]. Демонстрировано, что введение МСК животным с ОП приводило к снижению уровня МДА и повышению активности глутатионпероксидазы и супероксиддисмутазы (СОД), характеризующих состояние антиоксидантной системы. Одним из антиоксидантных механизмов МСК, по мнению He и соавт. (2016), является стимуляция секреции гиалуронат-связывающего белка TSG-6 (TNF- α индуцированный белок-6). При экспериментальном ОП у животных, которым вводили МСК с нокдауном гена TSG-6, уровень МДА был выше, а показатели состояния антиоксидантной системы были снижены. Это позволило предположить связь МСК с подавлением окислительного стресса и повреждения ткани ПЖ с продукцией TSG-6 [26]. МСК-опосредованная экспрессия белка TSG-6 вызывает подавление активации инфламмосомы NLRP3, активирующейся при ОП, созревание секреторируемого

ИЛ-1 β , что вызывает ослабление воспаления. Паракринная продукция МСК гемоксигеназы 1 (НО-1) также повышает резистентность клеток к апоптозу и некрозу, снижает воспалительную реакцию [40].

Иммуномодулирующий эффект МСК

Многочисленные исследования показали, что в группах животных с индуцированным ОП заметно повышались уровни провоспалительных цитокинов ФНО- α , ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-15, ИЛ-17 [26, 30, 33, 35, 42, 50, 51, 56, 58, 65]. После введения таким животным МСК уровень экспрессии этих маркеров воспаления снижался, а сниженный уровень цитокинов с противовоспалительной активностью (ИЛ-4, ИЛ-10) повышался после введения МСК [26, 27, 30, 33, 42, 50, 51, 56].

Другим механизмом иммуномодуляции МСК является их способность потенцировать переход от воспалительных макрофагов М1 к противовоспалительному состоянию макрофагов М2 [59]. При этом МСК подавляют функции активированных макрофагов М1 и усиливают активность М2 макрофагов, что оказывает противовоспалительный эффект. Qian и соавт. (2017) в своей работе показали значительное снижение уровня амфотерина (HMGB1) при лечении острого экспериментального панкреатита с помощью МСК по сравнению с контролем [51]. Высокотоксичный HMGB1 секретируется активированными макрофагами моноцитами и другими поврежденными клетками, и рассматривается как маркер и возможная терапевтическая мишень при сепсисе [46]. Выделяемый МСК TSG-6 обладает противовоспалительным действием, подавляя продукцию макрофагами провоспалительных цитокинов [26]. По данным Wang и соавт. (2020), TSG-6 взаимодействует с рецепторами CD44 на резидентных макрофагах и ингибирует активацию транскрипционного фактора NF- κ B, с которым связана активация иммунного ответа и продукция провоспалительных цитокинов [62]. Вопрос взаимодействия МСК и Т-лимфоцитов остается открытым, так как в литературе встречаются противоречивые мнения о влиянии МСК на активацию Т-лимфоцитов. Demols A.

и соавт. (2000) показали, что CD4+ Т-клетки играют ключевую роль в развитии повреждения тканей при ОП у лабораторных мышей, поскольку тяжесть заболевания уменьшалась за счет «истощения» CD4+ Т-клеток [20]. По данным Jung и соавт. (2011) в присутствии МСК увеличивается секреция IL-10 и экспрессия фактора транскрипции Foxp3, что способствует дифференцировке активированных Т-клеток в регуляторные Т-лимфоциты (Tregs), которые обладают потенциальной супрессорной активностью [30].

Миграция МСК в поджелудочную железу

Путь доставки МСК оказывает влияние на выживаемость клеток *in vivo* и ожидаемый терапевтический эффект [14]. Имеются данные, что 90% МСК, введенных внутривенно, оседает в легких, это вызывает много вопросов относительно их роли в регенерации тканей [30]. В литературе есть сообщения о том, что регенеративное действие МСК связано с паракринным выделением растворимых факторов, а также с выделением микровезикул, содержащих биологически активные вещества, а не с путем прямой дифференцировки в клетки ПЖ [10]. В исследовании He и соавт. (2016) использовали МСК человека, меченые иммунофлюоресцирующим маркером CFSE-A. Внутривенное введение мышам таких клеток приводило к снижению уровня амилазы и липазы в сыворотке крови, уменьшению отека и степени некроза ПЖ. Уже через 30 мин после инъекции меченые МСК определялись в легких, через 6 часов – в печени и селезенке и достигали максимального накопления в этих органах к концу 1-х суток. На протяжении всего периода эксперимента (72 часа) МСК в ПЖ не визуализировались [26]. По данным Zhao и соавт. (2016), методом полимеразной цепной реакции МСК обнаруживались в сердце, печени, селезенке и ПЖ на протяжении 48 часов после внутривенной инъекции [71]. В исследованиях Qian и соавт. (2015) установлено, что меченые МСК в уже в 1-е сутки визуализировались в ПЖ и максимальное их накопление отмечалось на 5–7 сутки после введения [50]. Эти исследования также показали, что при эксперименталь-

ном ОП в поврежденной ПЖ обнаруживается хемокин SDF1, вызывающих миграцию стволовых клеток в место повреждения.

Антиапоптотический и прорегенераторный эффект МСК

Некроз и апоптоз являются двумя основными путями гибели клеток. При апоптозе клеточные мембраны ацинарных клеток остаются неповрежденными, поэтому воздействия ферментов на паренхиму ПК не происходит. При некрозе клеток возникает разрушение органелл и разрыв внешней мембраны, в результате происходит высвобождение внутриклеточного содержимого во внеклеточное пространство и развивается воспаление [2]. Некротическая гибель ацинарных клеток является основным следствием воспаления в ПЖ, определяющая тяжесть и исход ОП. Так, в соответствии с модифицированной шкалой КТ – индекса тяжести по Baltathar, при некрозе более 50% ПЖ летальность пациентов с ОП составляет 17% [43]. При моделировании ОП в группе животных, которым для лечения применяли МСК, отек, инфильтрация воспалительными клетками и некроз ткани ПЖ были менее выражены по сравнению с контролем без применения МСК [26, 27, 29, 32, 33, 35, 56, 58, 65, 66, 71].

Как известно, апоптоз и некроз ацинарных клеток ПЖ имеют реципрокную трансформацию, поэтому уменьшение апоптоза ацинарных клеток может в определенной степени ослабить некроз ацинарных клеток [42]. Антиапоптотическое действие МСК при лечении экспериментального ОП было оценено TUNEL-методом [26, 29, 42, 56]. При таком исследовании без лечения МСК в ПЖ наблюдалось множество апоптотических ацинарных клеток, и их количество со временем увеличивалось. В группе животных, которым вводили МСК, количество апоптотических ацинарных клеток было значительно меньше. В исследовании Kwon и соавт. (2016) введение МСК крысам с травмой скелетных мышц тормозило гибель мышечных клеток путем секреции антиапоптотического хемокина XCL1 [34]. Другой механизм подавления апоптоза при лечении экспериментального ОП с помощью МСК

заключался в стимуляции секреции факторов ангиогенеза – фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), фактора роста гепатоцитов (HGF) и ангиопоэтина-1 (Ang-1) [27, 50]. Считается, что VEGF способен активировать мощные факторы-ингибиторы клеточной гибели, такие как протеин-киназа-B (серин-треонинкиназа, Akt). По другим данным, важнейшим механизмом развития апоптоза может являться действие АФК [8]. Поэтому антиапоптотическое действие МСК может быть связано со способностью ростовых факторов предотвращать оксидативный стресс, с нормализацией активности антиоксидантных ферментов и функции митохондрий по расходу кислорода. Так, было показано, что HGF увеличивает выживаемость клеток при оксидативном стрессе на модели инфаркта миокарда [44].

В исследовании Sun и соавт. (2021) меченые МСК через 7 дней после введения в хвостовую вену крысы методом иммунофлуоресценции определялись в поврежденной поджелудочной железе и экспрессировали маркеры клеток-предшественников ациноцитов (Ngn3, PDX-1, PTF-1a), уменьшали воспаление и ускоряли регенерацию поджелудочной железы [54].

Протективные свойства паракринных факторов, выделяемых МСК, при лечении ОП в эксперименте

Эндогенная интоксикация и расстройства макро- и микрогемодинамики являются ключевыми звеньями в развитии ПОН при остром некротизирующем панкреатите. Нами ранее было установлено, что у умерших от тяжелого ОП наиболее часто наблюдались поражения легких (83,1% случаев), головного мозга (70,2%), почек (69,3%), миокарда (67,1%) и печень (54,2%) [3]. Острое повреждение легких при ОП связано с повышением проницаемости эндотелиального и эпителиального барьера, просачиванием экссудата в альвеолярное пространство и интерстициальные ткани, что приводит к отеку легких и нарушению газообмена. При экспериментальном ОП введение крысам МСК уменьшало отек и повреждение легких, а также снижало экспрессию TNF- α и SP (нейропептид субстан-

ция-Р) в легочной ткани [40, 58]. Изменения со стороны почек проявляются в первую очередь нарушением почечной микроциркуляции с нарастающими процессами ишемии и дегенерации почечных канальцев. Снижение функции почек приводит к прогрессированию эндотоксикоза [3]. Введение МСК крысам с ОП снижало степень повреждения почек, что сопровождалось подавлением сигнального пути киназы RhoA/Rho (Rock) и повышением экспрессии белка ZO1, отвечающего за реконструкцию эндотелиальных клеток сосудов почек [17]. Было показано, что уровень киназы RhoA/Rho (Rock) в ткани ПЖ при тяжелом ОП повышен вместе с уровнем ФНО- α и ИЛ-6. Но они снижаются вместе с асцитом, уровнем сывороточной амилазы, ФНО- α и ИЛ-6 у крыс с ОП, леченых МСК костного мозга [10, 17, 25].

Ранним и тяжелым осложнением ОП является панкреатогенная энцефалопатия, связанная с развитием эндогенной интоксикации, повышающей проницаемость гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) [73]. Патологические изменения в тканях головного мозга проявляются отеком нейронов и геморрагическими очагами. В эксперименте у крыс при ОП это было подтверждено патоморфологически с использованием красителя Evans синий. Применение МСК в данном эксперименте вызывало подавление апоптоза эндотелиальных клеток микрососудов головного мозга, снижение повышенной проницаемости ГЭБ, повышение экспрессии белка клаудина-5 и уменьшение экспрессии цинк-зависимой эндопептидазы ММР-9, участвующей в ремоделировании тканей, ангиогенезе, пролиферации, миграции, дифференциации, апоптозе клеток [36].

Синдром энтеральной недостаточности при ОП характеризуется расстройствами микроциркуляции, нарушениями местного иммунитета и барьерной функции слизистой оболочки кишечника, транслокации токсинов и самих микроорганизмов в кровоток, выраженным парезом кишечника и появлением выпота в брюшной полости [21]. Введение МСК животным с экспериментальным ОП снижало степень повреждения эпителия тонкой кишки, пролиферацию кишечного

эпителия и способствовало восстановлению слизистой оболочки [58]. В другом исследовании установлена роль аквапорина-1 (AQP1) в развитии энтеральной недостаточности при экспериментальном ОП [39]. Усиление экспрессии AQP1 после введения МСК приводило к уменьшению степени повреждения эндотелиальных клеток тонкой кишки крыс с ОП.

Клиническое применение и перспективы клеточной терапии при ОП

Несмотря на установленную эффективность и безопасность различных типов МСК для лечения экспериментального ОП, их клиническое применение имеет ряд ограничений. Во-первых, до конца не выяснены механизмы потенциального терапевтического действия МСК при ОП, приводящие к подавлению воспаления и апоптоза, усилению ангиогенеза. Во-вторых, при описании краткосрочного терапевтического эффекта недостаточно изучены неблагоприятные побочные эффекты и отдаленные последствия применения МСК. Кроме того, остается не до конца изученным риск онкогенности МСК, который наблюдался у экспериментальных животных, но не описан у человека [72]. В литературе преимущественно описано внутривенное введение клеток и не приведены результаты внутриартериального или внутримышечного пути доставки МСК при лечении экспериментального ОП. Значительная часть ПЖ кровоснабжается за счет селезеночной артерии, поэтому перспективным направлением может стать эндоваскулярное внутриартериальное введение МСК в селезеночную артерию или чревный ствол, что требует изучения.

Применение МСК также имеет свои ограничения, так как они плохо хранятся и требуют введения в течение 2-4-8 часов после получения *in vitro*, при введении пациентам большинство клеток погибает в течение 2-5 суток. В результате разрушения клеток у пациентов могут возникать нежелательные респираторные и воспалительные реакции [52]. Поэтому в последнее время исследователи начали все больше обращать внимание на возможность использования микрочастиц/микровезикул МСК (МВ МСК). МВ МСК получают из культу-

ральной среды при поддержании МСК *in vitro* в условиях легкого клеточного стресса, не вызывающего гибели клеток. При этом МВ отшнуровываются от клеток и несут на себе участки внешней мембраны МСК. Они стабильны и могут храниться в замороженном виде в течение 1 года без потери физиологической активности [28]. МВ обладают биологической активностью, присущей МСК – стимулируют ангиогенез, модулируют иммунные реакции, подавляют апоптоз, усиливают клеточную пролиферацию [15]. МВ МСК имеют размеры 0,1–1,0 мкм и легко отделяются центрифугированием от клеток [37]. Использование МВ МСК оказалось благоприятным при лечении повреждения суставов (остеоартрите) у мышей [57], травматического повреждения и моделированной болезни Альцгеймера у крыс [68], инфаркта миокарда у крыс [64], моделированной аллергической астмы у мышей [19], легочной артериальной гипертензии [16], индуцированного фиброза печени у мышей [53], острого пиелонефрита у мышей [69]; ожогах кожи у крыс [67]. На модели экспериментального ОП, вызванного натрием таурохолатом, Yin G с соавт. (2016) оценили способность микровезикул МСК костного мозга крыс вызывать торможение воспалительного процесса в течение 24 часов наблюдения [65]. Гистологически было показано, что МВ МСК вызывают снижение интенсивности воспалительной реакции, некроза тканей, накопления нейтрофилов, а также снижение уровня сывороточных ИЛ-6 и ФНО- α . Сделан вывод о способности МВ МСК снижать воспалительные реакции на ранних этапах развития экспериментального ОП. На более поздних сроках наблюдения эффективность МВ МСК не изучалась. Таким образом, наряду с МСК для противовоспалительной и регенеративной терапии при остром экспериментальном панкреатите в сравнительном плане могут быть использованы микровезикулы, полученные из МСК.

Еще один подход, используемый в регенеративной медицине – использование плазмы,

обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов (ПОРФТ/*platelet-rich plasma*/PRP). В хирургической практике за последние 10–15 лет PRP достаточно широко применяется для лечения поверхностных язв кожи, остеоартрита и другой патологии костно-мышечной системы [6]. Локальное применение PRP оказывает противовоспалительное, антибактериальное и ранозаживляющее действие [70]. При региональном применении ПОРФТ/PRP оказывает нутритивное, антиапоптотическое, иммуномодулирующее и регенеративное действие на поврежденные органы и ткани. Так, подкожное введение PRP по 0,5 мл дважды в неделю в течение 3 недель вызывало значительное большее сохранение количества β -клеток в поджелудочной железе крыс со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом [23]. При локальной обработке ран пациентов, оперированных по поводу рака поджелудочной железы, ПОРФТ/PRP вызвало ускорение их заживления с 32 (31–35) дней до 26,5 дней (24,8–28) дней [63].

Выводы

Анализ данных литературы свидетельствуют о том, что разработка эффективных методов использования клеточной трансплантации при различной патологии в настоящее время находится в центре внимания исследователей во всем мире. Применение биопродуктов клеточного происхождения при ОП показывает в эксперименте убедительное положительное воздействие. Поэтому задача дальнейших экспериментальных исследований – сравнительная оценка и определение наиболее эффективного метода использования МСК, их дериватов в виде микровезикул, а также ПОРФТ/PRP при остром экспериментальном панкреатите, сопровождающегося некрозом ткани поджелудочной железы.

С использованной литературой можно ознакомиться в редакции.

Поступила 20.04.2022