

УДК: 616-092.9

Д. Ю. Гребнев <sup>1,2</sup>, В. Н. Слаутин <sup>1</sup>,  
И. Ю. Маклакова <sup>1,2</sup>, О. Ю. Береснева <sup>1</sup>, К. Ю. Конышев <sup>1,2</sup>

## МЕХАНИЗМЫ АНТИФИБРОТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПЛАЦЕНТАРНЫХ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет»

г. Екатеринбург, Российская Федерация;

<sup>2</sup> ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»,

г. Екатеринбург, Российская Федерация

**Резюме.** *Целью* исследования являлось изучение механизмов действия мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) на модели тетрахлорметан-индуцированного фиброза печени у мышей. *Материалы и методы.* Эксперименты проведены на 50 мышах. В исследовании были использованы ММСК, выделенные из хориона плаценты мышей. Трансплантация ММСК осуществлялась в дозе 1 млн клеток в хвостовую вену. Для оценки механизмов действия ММСК иммуногистохимическим методом производился анализ  $\alpha$ -SMA, MMP-9, MMP13, а также TIMP-1 положительных областей. Для окраски на соединительную ткань был использован краситель Sirius red. Иммуноферментным методом в гомогенате печени проведено определение HGF и TGF- $\beta$ . *Результаты.* Получено, что трансплантация ММСК приводит к снижению площади  $\alpha$ -SMA, TIMP-1 положительных областей, увеличению количества клеток, экспрессирующих MMP-9 и MMP13. Обнаружено повышение уровня фактора роста гепатоцитов и снижение трансформирующего фактора роста бета в гомогенате печени после трансплантации ММСК при фиброзе печени. Результаты исследования продемонстрировали эффективность плацентарных ММСК при фиброзе печени. К антифибротическим механизмам действия ММСК можно отнести способность увеличивать экспрессию HGF, снижать уровень TGF- $\beta$ , повышать выработку матриксных металлопротеиназ -9 и -13, а также способность ингибировать экспрессию тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ 1 типа.

**Ключевые слова:** мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, перисинусоидальные клетки печени Ито, фиброз печени

Конфликт интересов отсутствует.

Контактная информация автора, ответственного за переписку:

Гребнев Дмитрий Юрьевич

dr-grebnev77@mail.ru

Дата поступления 17.10.2022 г.

Образец цитирования:

Гребнев Д.Ю., Слаутин В.Н., Маклакова И.Ю., Береснева О.Ю., Конышев К.Ю. Механизмы антифибротического действия плацентарных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. [Электронный ресурс] Вестник уральской медицинской академической науки. 2022, Том 19, №4, с. 355–364, DOI: 10.22138/2500-0918-2022-19-4-355-364

### Введение

Заболеваемость фиброзом печени и смертность от его терминальной стадии — цирроза — имеет стойкую тенденцию к росту. Так, число впервые выявленных случаев цирроза печени за последние десять лет выросло на 12%. К наиболее распространённым причинам развития фиброза печени относятся хронический вирусный гепатит С (19,1–25,1% случаев) и алкогольная болезнь печени (35,5–40,9% случаев) [1, 21]. Смертность от цирроза печени, по данным ВОЗ, занимает девятое место в

мире и достигает 1,8% в европейских странах, что составляет от 13 до 30 случаев на 100 тыс. населения. В России эти цифры, по разным источникам, достигают 60 случаев на 100 тыс. населения [1, 2].

В настоящее время не разработано эффективных консервативных методов лечения терминальных стадий фиброза печени. Консервативное лечение направлено на устранение этиологического фактора, симптоматическое лечение и купирование осложнений. Единственным эффективным методом лечения остаётся трансплантация печени. Однако трансплантация печени обладает существенными недостатками, такими как высокая стоимость процедуры, нехватка доноров и длинные листы ожидания, а также высокая частота хирургических осложнений [1, 3].

Таким образом, всё более актуальным становится поиск альтернативных нехирургических методов лечения. Особое внимание привлекает трансплантация мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) благодаря их иммуномодулирующим, противовоспалительным и антифибротическим свойствам [4, 5].

Известно, что ММСК синтезируют фактор роста гепатоцитов (HGF) — один из основных антагонистов трансформирующего фактора роста (TGF- $\beta$ ). HGF обладает широким спектром действий, в том числе антифибротическим, противовоспалительным, антиоксидантным и ангиогенным. Антифибротическое действие HGF заключается в ингибировании канонического и неканонических путей TGF- $\beta$ , а также других профиброгенных факторов роста (в том числе фактора роста соединительной ткани — CTGF, фактора роста тромбоцитов — PDGF). К противовоспалительному механизму HGF относится способность ингибировать первую стадию миграции лейкоцитов — стадию краевого стояния — через подавление экспрессии молекул адгезии. Основным источником HGF в печени являются покоящиеся перисинусоидальные клетки печени Ито. Однако при активации они теряют эту способность, приобретая рецепторы к HGF на поверхности клеток. Взаимодействие фактора роста гепатоцитов со своим рецептором (C-met) может запускать апоптоз активированных клеток печени Ито. Это может свидетельствовать о потенциальной обратимости фиброза печени [6, 7, 8].

ММСК также продуцируют матриксные металлопротеиназы (ММП-9, ММП-13). Равновесие между матриксными металлопротеиназами и их ингибиторами позволяет поддерживать оптимальное состояние внеклеточного матрикса. Смещение баланса в сторону фиброгенеза происходит вследствие активации клеток Ито, которые экспрессируют повышенные уровни тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ 1 типа (TIMP-1). Семейство желатиназ (в том числе ММП-9) и коллагеназ (в том числе ММП-13) играют важную роль в разрушении избыточного внеклеточного матрикса [9, 10].

Противовоспалительное действие ММСК может проявляться за счет выработки противовоспалительных цитокинов, в том числе IL-4, IL-10 [4, 5].

В нашем исследовании мы остановились на плацентарных ММСК, так как они обладают рядом преимуществ по сравнению с ММСК, выделенными из других источников: нехирургический метод получения, высокая пролиферативная активность и пролиферативный потенциал [11].

Для изучения механизмов антифиброгенного действия плацентарных ММСК был смоделирован фиброз печени у мышей путем внутрибрюшинного введения тетрахлорметана. Молекула тетрахлорметана (CCL<sub>4</sub>) нетоксична. Однако ее взаимодействие с цитохромом P450 при участии фермента CYP2E1 в гепатоцитах приводит к образованию токсичного метаболита и двух свободных радикалов (трихлорметильного CCl<sub>3</sub>- и трихлорметилпероксильного CCl<sub>3</sub>OO-), индуцирующих окислительный стресс. Это приводит к развитию некроза и апоптоза гепатоцитов, что вызывает развитие воспалительной реакции. Описанные события запускают процесс активации и дифференцировки перисинусоидальных клеток Ито в миофибробласты, которые экспрессируют избыточное количество соединительной ткани, белка  $\alpha$ -SMA, избыточное количество TIMP-1, а также TGF- $\beta$  [12, 13, 14, 15, 16].

TGF- $\beta$  является одним из основных профиброгенных факторов развития фиброза печени, который реализует своё действие через активацию клеток Ито и поддержание их активированного состояния. Это приводит к избыточному синтезу соединительной ткани и нарушению баланса между матриксными металлопротеиназами и их тканевыми ингибиторами в сторону фиброгенеза за счёт избыточной экспрессии TIMP-1. TGF- $\beta$  также влияет на выработку широкого спектра факторов роста, в том числе на фактор роста соединительной ткани (CTGF), повышая его экспрессию и усиливая его профиброгенные свойства, путём расщепления на два более активных метаболита. Кроме того, TGF- $\beta$  снижает экспрессию HGF — его главного антагониста [17, 18, 19].

Избыточная продукция соединительной ткани, нарушение равновесия между матриксными металлопротеиназами и их ингибиторами приводит к развитию фиброза печени [16, 20].

Таким образом, **целью** настоящего исследования являлось изучение механизмов антифиброгенного действия плацентарных ММСК.

### Материалы и методы исследования

Эксперименты выполнены на 50 мышах самцах в возрасте 8–10 недель (масса 20–22 г). Содержание животных и дизайн исследования были одобрены этическим комитетом ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России. При проведении экспериментов были соблюдены этические нормы и рекомендации по гуманному отношению к лабораторным животным, изложенные в «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей», и в Приказе Минздрава России №199н от 01.04.2016 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» по содержанию, уходу, кормлению, выводу из эксперимента и последующей утилизации. До и во время эксперимента мыши находились в виварии при температуре воздуха +20–22°C, в световом режиме — день–ночь. До начала эксперимента и во время исследования мышей содержали на стандартном рационе.

С целью исключения сезонных колебаний изучаемых показателей эксперименты были выполнены в осенне-зимний период. Забор материала (кровь, печень) был осуществлен в утренние часы. Выведение животных из эксперимента осуществляли цервикальной дислокацией.

Распределение животных по группам исследования в соответствии с поставленными задачами представлены в таблице 1.

Исследования проведены в два этапа. На первом этапе производилось моделирование фиброза. При этом было выделено 2 группы (по 10 животных в каждой) — контрольная и опытная. Животным опытной группы с целью моделирования фиброза печени осуществлялось регулярное введение внутривентриально тетрахлорметана в количестве 2 мкл/г веса животного в растворе персикового масла (1:4) в течение 6 недель 2 раза в неделю. Мышам контрольной группы осуществлялось эквивалентное введение персикового масла (2 мкл/г; ГаленоФарм, Россия) внутривентриально в течение 6 недель 2 раза в неделю.

На втором этапе животные, у которых был индуцирован фиброз печени после введения тетрахлорметана, были разделены на основную группу и группу сравнения. Основная группа — мыши, которым однократно внутривенно (в хвостовую вену) вводили ММСК в количестве  $1 \times 10^6$  клеток/мышь в 0,2 мл PBS (Phosphate-buffered saline, фосфатно-солевой буфер, pH 7,4). Группу сравнения составили мыши, которым после моделирования фиброза не вводили клетки. Через 5 недель после моделирования фиброза печени производилась оценка эффективности проводимой терапии. Группу интактных животных составили мыши, которым не осуществлялось введение клеток и персикового масла.

Выделение культуры плацентарных ММСК осуществлялось согласно методу А.С. Тепляшина с соавт. 2004. Жизнеспособность выделенных клеток оценивали с помощью 7-AAD на проточном цитометре Beckman Coulter Navios с использованием набора Mouse Mesenchymal Stem Cell Multi-Color Flow Cytometry Kit (Bio-Techne, США). Жизнеспособность клеток с иммунофенотипом положительных по CD105, CD29, Sca-1 и отрицательных по CD45 составила 95,4%.

Для гистологического исследования из левой доли печени были получены кусочки размером 10x10x5 мм, которые в дальнейшем фиксировали в 10% растворе нейтрального забуференного формалина («Ретиноиды», Россия). Были изготовлены срезы толщиной 3–5 мкм. После депарафинизации гистологические препараты были окрашены Sirius Red, также проводились иммуногистохимические исследования. Для каждого экспериментального животного делали микрофотографии без перекрытия по всей поверхности среза печени при объективе  $\times 20$ .

Микропрепараты от каждого экспериментального животного исследовались с использованием светового микроскопа Axio Scope.A1 («CarlZeiss», Германия). Для анализа микрофотографий использована морфометрическая программа SIAMS (ООО «Сиамс», Россия).

Для оценки тяжести фиброза использовалась шкала METAVIR.

Количественный анализ содержания коллагена в печени проводили с использованием набора Picro Sirius Red Stain Kit (Abcam, UK).

В каждом препарате печени было проанализировано 15 областей площадью по 0,28 мм<sup>2</sup>. Общая

распространенность фиброза в печени была выражена в процентах и определена как отношение окрашенной области (соединительная ткань) к общей площади анализируемого препарата.

Итоговое значение общей выраженности фиброза и фиброза в паренхиме печени определялось как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение в 15 областях.

### Иммуногистохимическое исследование печени

Подготовленные гистологические препараты инкубировали с первичными кроличьими специфическими к мыши антителами (Abcam, UK) в течение 12 часов при температуре  $+4^{\circ}\text{C}$ :

1. MMP9 (matrix metalloproteinase, MMP, матриксная металлопротеиназа; Recombinant Anti-MMP9 antibody), 1: 5000.

2. MMP13 (matrix metalloproteinase, MMP, матриксная металлопротеиназа; Recombinant Anti-MMP13 antibody), 1: 500.

3. TIMP1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1, тканевой ингибитор металлопротеиназ-1; Anti-TIMP1 antibody), 1: 500.

4.  $\alpha$ -SMA (Alpha-smooth muscle actin, альфа гладкомышечный актин; Recombinant Anti-alpha smooth muscle Actin antibody), 1: 1000.

Срезы инкубировали с вторичными антителами Goat Anti-RabbitIgG H&L (HRP) при комнатной температуре в течение 2 часов, 1: 500 (Abcam, UK).

Для выполнения иммуногистохимических исследований была использована система детекции с субстратом пероксидазы (DAB Substrate Kit, набор для приготовления рабочего раствора диаминобензидина) (Abcam, UK).

Окраска ядер клеток гистологического препарата была проведена с использованием гематоксилина Майера (Avantor, Нидерланды).

Определение факторов роста HGF и TGF- $\beta$  в гомогенате печени проводили методом иммуноферментного анализа с использованием наборов: Mouse HGF SimpleStep ELISA<sup>®</sup> Kit (Abcam, UK), Mouse TGF beta 1 ELISA Kit (Abcam, UK).

Полученные данные обрабатывались вариационно-статистическим методом с использованием t-критерия Стьюдента. При отсутствии нормальности распределения статистическую значимость различий определяли, используя непараметрический критерий Манна-Уитни (U). Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты исследования

При анализе гистологической картины препарата печени через 5 недель после введения ММСК на фоне фиброза печени отмечен эффект от трансплантации клеток. Было установлено, что количество животных с 3 стадией фиброза по шкале METAVIR снизилось на 50,0%, увеличилось количество мышей со 2 стадией фиброза на 50,0%, у 20% мышей выраженность фиброза соответствовала 1 стадии (таблица 1).

Таблица 1  
Количество мышей с различными стадиями фиброза по шкале METAVIR  
Table 1  
The number of mice with different stages of fibrosis according to the METAVIR scale

Группа/ Group	Стадия 0/ Stage 0	Стадия 1/ Stage 1	Стадия 2/ Stage 2	Стадия 3/ Stage 3	Стадия 4/ Stage 4
Группа сравнения/ Comparison group	0	0	2	8	0
Основная группа/ Main group	0	2	4	4	0

Эти результаты были дополнены определением содержания соединительной ткани с использованием специфической окраски к фибриллярному коллагену. Анализ микрофотографий препаратов печени позволил установить, что площадь соединительной ткани снизилась на 33,18% по сравнению с животными, которым не вводились клетки. Учитывая, что основным источником избыточного образования внеклеточного матрикса являются миофибробласты, представляло интерес определение

количества таких клеток. После определения  $\alpha$ -SMA положительной области выявлено снижение экспрессии данного белка (таблица 2).

Таблица 2

Содержание соединительной ткани и экспрессия белка  $\alpha$ -SMA в печени мышей через 5 недель после введения ММСК

Table 2

Connective tissue content and expression of  $\alpha$ -SMA protein in the liver of mice 5 weeks after administration of MMSC

Показатель/ Indicator	Значения/ Values	
	Группа сравнения/ Comparison group	Основная группа/ Main group
Площадь соединительной ткани (%)/ Connective tissue area (%)	7,33±0,80	4,90±0,30 *
Площадь $\alpha$ -SMA окрашенной области (%)/ Area of $\alpha$ -SMA of the colored area (%)	11,20±1,36	6,90±1,56 *

Примечание: \* отличие от группы сравнения, достоверно с  $p < 0,05$ .

Note: \* the difference from the comparison group is significant with  $p < 0.05$ .

Следствием уменьшения количества миофибробластов было уменьшение количества не только соединительной ткани в органе, но и экспрессии тканевого ингибитора матричных металлопротеиназ-1. В исследовании было обнаружено уменьшение количества TIMP-1 окрашенной области в гистологическом препарате печени на 25,76%. Обращает на себя внимание повышение соотношения экспрессии матричных металлопротеиназ к TIMP-1 после введения ММСК относительно группы сравнения. Это обусловлено как повышением экспрессии MMP9 и MMP13 после трансплантации клеток, так и ингибированием выработки TIMP-1 (таблица 3).

Таблица 3

Уровень матричных металлопротеиназ и тканевого ингибитора матричных металлопротеиназ-1 в печени мышей через 5 недель после моделирования фиброза печени на фоне введения ММСК в дозе 1 млн клеток/кг

Table 3

The level of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 in the liver of mice 5 weeks after modeling liver fibrosis against the background of MMSC administration at a dose of 1 million cells/kg

Показатели/ Indicator	Значения	
	Группа сравнения/ Comparison group	Основная группа/ Main group
Площадь (%) MMP9 окрашенной области/ Area (%) MMP 9 of the painted area	1,48±0,13	1,85±0,12 *
Площадь (%) MMP13 окрашенной области/ Area (%) MMP13 of the unpainted area	8,54±0,88	14,04±1,10 *
Площадь (%) TIMP-1 окрашенной области/ Area (%) TIMP-1 of the painted area	12,81±0,99	9,51±0,72 *
Площадь MMP9/ площадь TIMP-1 окрашенной области (%)/ MMP area 9/ TIMP-1 area of the painted area (%)	0,12±0,02	0,20±0,02*
Площадь MMP13/ площадь TIMP-1 окрашенной области (%)/ MMP13 area/ TIMP-1 area of the painted area (%)	0,67±0,06	1,48±0,14*

Примечание: \* отличие от группы сравнения, достоверно с  $p < 0,05$ .

Note: \* the difference from the comparison group is significant with  $p < 0.05$ .

По современным представлениям, ММСК синтезируют различные матричные металлопротеиназы, в том числе MMP9 и MMP13. Мы связываем повышение экспрессии изучаемых матричных металлопротеиназ не только с выработкой их аутологичными ММСК, но и с продукцией этих ферментов рекрутированными ММСК. Последние могут вовлекаться в процесс разрушения избыточного количества внеклеточного матрикса путем их направленной миграции под действием хемоаттрактанта (SDF-1, stromal derived factor-1, стромой вырабатываемый фактор-1).

Определение экспрессии факторов роста и уровня матриксных металлопротеиназ позволило определить механизм действия ММСК на регресс соединительной ткани. Содержание TGF- $\beta$  было снижено относительно группы сравнения, что было следствием уменьшения количества клеток ( $\alpha$ -SMA + миофибробласты), продуцирующих данный фактор роста. Трансформирующий фактор роста — это один из ключевых механизмов самоактивации миофибробластов, продуцирующих фибриллярные коллагены в печени. Содержание фактора роста гепатоцитов, напротив, значительно увеличилось, что могло быть обусловлено нарушением дифференцировки клеток печени Ито в миофибробласты (таблица 4).

Таблица 4  
Содержание факторов роста в гомогенате печени мышей  
Table 3  
The content of growth factors in mouse liver homogenate

Показатель/ Indicator	Значения	
	Группа сравнения/ Comparison group	Основная группа/ Main group
Содержание HGF пг/г печени/ The content of HGF pg/g of liver	610,98±30,87	1051,32±75,36 *
Содержание TGF- $\beta$ нг/г печени/ The content of TGF- $\beta$ ng/g of the liver	23,05±1,40	19,09±1,79 *

Примечание: \* отличие от группы сравнения, достоверно с  $p < 0,05$ .

Note: \* the difference from the comparison group is significant with  $p < 0.05$ .

Согласно современным данным,  $\alpha$ -SMA+ миофибробласты — это ключевой участник выработки TGF- $\beta$ , и, в то же время, эти клетки после дифференцировки из клеток печени Ито теряют способность к синтезу HGF.

Следует отметить способность ММСК к продукции фактора роста гепатоцитов. Мы связываем увеличение экспрессии HGF в печени не только с продукцией аллогенных ММСК, но также и с выработкой этого фактора роста аутологичными ММСК. Миграция аутологичных ММСК в печень может быть обусловлена способностью этих клеток к выработке хемоаттрактанта (SDF-1, stromal cell-derived factor-1, стромой вырабатываемый фактор-1).

В ряде исследований был показан антифибротический эффект ММСК. При этом механизмы выявленного эффекта не были установлены [5, 22, 23, 24]. В настоящем исследовании показана роль матриксных металлопротеиназ, ингибитора матриксных металлопротеиназ, а также факторов роста в восстановлении структуры печени после трансплантации ММСК.

## ЛИТЕРАТУРА

- Ивашкин В.Т., Маевская М.В., Жаркова М.С., Жигалова С.Б., Киценко Е.А., Манукьян Г.В., Труханов А.С., Маев И.В., Тихонов И.Н., Деева Т.А. Клинические рекомендации Российского общества по изучению печени и Российской гастроэнтерологической ассоциации по диагностике и лечению фиброза и цирроза печени и их осложнений. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2021;31(6):56–102. <https://doi.org/10.22416/1382-4376-2021-31-6-56-102>
- Мехтиев С.Н., Степаненко В.В., Зиновьева Е.Н., Мехтиева О.А. Современные представления о фиброзе печени и методах его коррекции. Фарматека 2014, Vol. 6, pp. 80–87.
- Safinia N., Vaikunthanathan T., Lechler R.I., Sanchez-Fueyo A., Lombardi G. Advances in Liver Transplantation: where are we in the pursuit of transplantation tolerance? Eur. J. Immunol. 2021, Vol. 51, pp. 2373–2386. DOI: 10.1002/eji.202048875.
- Le Blanc K., Davies L.C. MSCs—cells with many sides. Cytotherapy 2018, Vol. 20, pp. 273–278. DOI: 10.1016/j.jcyt.2018.01.009.
- Zhang L., Ma X.J.N., Fei Y.Y., et al. Stem cell therapy in liver regeneration: Focus on mesenchymal stem cells and induced pluripotent stem cells. Pharmacol. Ther. 2022, Vol. 232, pp. 108004. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2021.108004.
- Yu J.L., Li J.H., Chengz R.G., et al. Effect of matriline on transforming growth factor  $\beta$ 1 and hepatocyte growth factor in rat liver fibrosis model. Asian Pac. J. Trop. Med. 2014, Vol. 7, pp. 390–393. DOI: 10.1016/

S1995-7645(14)60062-6.

7. Atta H., El-Rehany M., Hammam O., et al. Mutant MMP-9 and HGF gene transfer enhance resolution of CCL4-induced liver fibrosis in rats: Role of ASH1 and EZH2 methyltransferases repression. *PLoS One* 2014, Vol. 9, pp. 1–11. DOI: 10.1371/journal.pone.0112384.

8. Zhang S. hong, Wen K. ming, Wu W., Li W. yan, Zhao J. nong. Efficacy of HGF carried by ultrasound microbubble-cationic nano-liposomes complex for treating hepatic fibrosis in a bile duct ligation rat model, and its relationship with the diffusion-weighted MRI parameters. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* 2013, Vol. 37, pp. 602–607. DOI: 10.1016/j.clinre.2013.05.011.

9. Apte S.S., Parks W.C. Metalloproteinases: A parade of functions in matrix biology and an outlook for the future. *Matrix Biol.* 2015, Vol. 44–46, pp. 1–6. DOI: 10.1016/j.matbio.2015.04.005.

10. Geervliet E., Bansal R. Matrix Metalloproteinases as Potential Biomarkers and Therapeutic Targets in Liver Diseases. *Cells* 2020, Vol. 9, DOI: 10.3390/cells9051212.

11. Beeravolu N., McKee C., Alamri A., et al. Isolation and characterization of mesenchymal stromal cells from human umbilical cord and fetal placenta. *J. Vis. Exp.* 2017, Vol. 2017, pp. 1–13. DOI: 10.3791/55224.

12. Faccioli L.A.P., Dias M.L., Paranhos B.A., dos Santos Goldenberg R.C. Liver cirrhosis: An overview of experimental models in rodents. *Life Sci.* 2022, Vol. 301, pp. 120615. DOI: 10.1016/j.lfs.2022.120615.

13. Надобин Д.С. Влияние биорегуляторов, выделенных из печени и сыворотки крови млекопитающих, на заместительную регенерацию печени мыши: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. МГУИм. М.В. Ломоносова, Москва, 2016, pp. 110.

14. Scholten D., Trebicka J., Liedtke C., Weiskirchen R. The carbon tetrachloride model in mice. *Lab. Anim.* 2015, Vol. 49, pp. 4–11. DOI: 10.1177/0023677215571192.

15. Higashi T., Friedman S.L., Hoshida Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2017, Vol. 121, pp. 27–42. DOI: 10.1016/j.addr.2017.05.007.

16. Gandhi C.R. Hepatic stellate cell activation and pro-fibrogenic signals. *J. Hepatol.* 2017, Vol. 67, pp. 1104–1105. DOI: 10.1016/j.jhep.2017.06.001.

17. Gough N.R., Xiang X., Mishra L. TGF- $\beta$  Signaling in Liver, Pancreas, and Gastrointestinal Diseases and Cancer. *Gastroenterology* 2021, Vol. 161, pp. 434–452.e15. DOI: 10.1053/j.gastro.2021.04.064.

18. Li Y., Fan W., Link F., Wang S., Dooley S. Transforming growth factor  $\beta$  latency: A mechanism of cytokine storage and signalling regulation in liver homeostasis and disease. *JHEP Reports* 2022, Vol. 4, pp. 100397. DOI: 10.1016/j.jhepr.2021.100397.

19. Ong C.H., Tham C.L., Harith H.H., Firdaus N., Israf D.A. TGF- $\beta$ -induced fibrosis: A review on the underlying mechanism and potential therapeutic strategies. *Eur. J. Pharmacol.* 2021, Vol. 911, pp. 174510. DOI: 10.1016/j.ejphar.2021.174510.

20. Puche J.E., Saiman Y., Friedman S.L. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Compr. Physiol.* 2013, Vol. 3, pp. 1473–1492. DOI: 10.1002/cphy.c120035.

21. Крохина Н.Б., Шешенина А.В., Сазонов С.В., Серов Н.А. Значение гистохимической и иммуногистохимической этиологической диагностики хронического вирусного гепатита В. *Вестник Уральской межрегиональной академической науки.* 2009. №1 (23). С. 78-80

22. Pinheiro D., Dias I., Freire T., et al. Effects of mesenchymal stem cells conditioned medium treatment in mice with cholestatic liver fibrosis. *Life Sci.* 2021, Vol. 281, pp. 119768. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.119768.

23. Iwasawa T., Nojiri S., Tsuchiya A., et al. Combination therapy of Juzentaihoto and mesenchymal stem cells attenuates liver damage and regresses fibrosis in mice. *Regen. Ther.* 2021, Vol. 18, pp. 231–241. DOI: 10.1016/j.reth.2021.07.002.

24. Mazhari S., Gitiara A., Baghaei K., et al. Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and imatinib in a rat model of liver fibrosis. *Eur. J. Pharmacol.* 2020, Vol. 882, pp. 173263. DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.173263.

Авторы

Гребнев Дмитрий Юрьевич

Доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой патологической физиологии

dr-grebnev77@mail.ru

Слаутин Василий Николаевич  
Аспирант кафедры патологической физиологии  
vas-slautin@yandex.ru

Маклакова Ирина Юрьевна  
Доктор медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой нормальной физиологии  
Makliu@mail.ru

Береснева Ольга Юрьевна  
Кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры гистологии

Коньшев Константин Юрьевич  
Кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры гистологии  
kon-konyshev@yandex.ru

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет», Министерства здравоохранения Российской Федерации  
Российская Федерация, 620028, Екатеринбург, ул. Репина, 3

*D. Ju. Grebnev*<sup>1,2</sup>, *V.N. Slautin*<sup>1</sup>, *I.Ju. Maklakova*<sup>1,2</sup>,  
*O. Y. Beresneva*<sup>1</sup>, *K. Y. Konyshev*<sup>1,2</sup>

## MECHANISMS OF ANTIFIBROTIC ACTION OF PLACENTAL MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELLS

<sup>1</sup> Federal State Budgetary Institution of Higher Professional Education «Urals State Medical University», Yekaterinburg, Russian Federation

<sup>2</sup> Institute of Medical Cell Technologies, Yekaterinburg, Russian Federation

**Abstract.** *The aim* of the study was to investigate the mechanisms of action of multipotent mesenchymal stromal cells (MMSCs) in a model of tetrachloromethane-induced liver fibrosis in mice. The experiments were performed on 50 mice. MSCs isolated from mouse placenta choriona were used in the study. MSCs were transplanted at a dose of 1 million cells into the tail vein.  $\alpha$ -SMA, MMP-9, MMP 13, and TIMP-1 positive regions were analyzed by immunohistochemical method to evaluate the mechanisms of MMSCs action. Sirius red dye was used for connective tissue staining. HGF and TGF- $\beta$  were determined by immunoassay in liver homogenate. We obtained that transplantation of MMSCs leads to a decrease in the area of  $\alpha$ -SMA, TIMP-1 positive regions, an increase in the number of cells expressing MMP-9 and MMP 13. An increase in the level of hepatocyte growth factor and a decrease in transforming growth factor beta in liver homogenate after hMSCs transplantation in liver fibrosis was found. *The results* of the study demonstrated the efficacy of placental MMSCs in liver fibrosis. The antifibrotic mechanisms of action of hMSCs can include the ability to increase the expression of HGF, decrease the level of TGF- $\beta$ , increase the production of matrix metalloproteinases-9 and -13, as well as the ability to inhibit the expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases type 1.

**Keywords:** multipotent mesenchymal stromal cells, HSC, liver fibrosis

There is no conflict of interest.

Contact details of the corresponding author:

Dmitrij Ju. Grebnev  
dr-grebnev77@mail.ru

Received 17.10.2022

For citation:

Grebnev D.Ju., Slautin V.N., Maklakova I.Ju., Beresneva O.Y., Konyshov K.Y. Mechanisms of antifibrotic action of placental multipotent mesenchymal stromal cells. [Online] Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki. = Journal of Ural Medical Academic Science. 2022, Vol. 19, no. 4, pp. 355–364. DOI: 10.22138/2500-0918-2022-19-4-355-364 (In Russ)

## REFERENCES

1. Ivashkin V.T., Maevskaya M.V., Zharkova M.S., Zhigalova S.B., Kitsenko E.A., Manukyan G.V., Trukhmanov A.S., Maev I.V., Tikhonov I.N., Deeva T.A. Clinical Recommendations of the Russian Scientific Liver Society and Russian Gastroenterological Association on Diagnosis and Treatment of Liver Fibrosis, Cirrhosis and Their Complications. Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology. 2021;31(6):56–102. <https://doi.org/10.22416/1382-4376-2021-31-6-56-102>. (InRuss.).
2. Mehtiev S.N., Stepanenko V.V., Zinov'eva E.N., Mehtieva O.A. Modern ideas about liver fibrosis and methods of its correction. Pharmateca=Farmateka 2014, Vol. 6, pp. 80–87. (InRuss.).
3. Safinia N., Vaikunthanathan T., Lechler R.I., Sanchez-Fueyo A., Lombardi G. Advances in Liver Transplantation: where are we in the pursuit of transplantation tolerance? Eur. J. Immunol. 2021, Vol. 51, pp. 2373–2386. DOI: 10.1002/eji.202048875.
4. Le Blanc K., Davies L.C. MSCs—cells with many sides. Cytotherapy 2018, Vol. 20, pp. 273–278. DOI: 10.1016/j.jcyt.2018.01.009.
5. Zhang L., Ma X.J.N., Fei Y.Y., et al. Stem cell therapy in liver regeneration: Focus on mesenchymal stem cells and induced pluripotent stem cells. Pharmacol. Ther. 2022, Vol. 232, pp. 108004. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2021.108004.
6. Yu J.L., Li J.H., Chengz R.G., et al. Effect of matrine on transforming growth factor  $\beta$ 1 and hepatocyte growth factor in rat liver fibrosis model. Asian Pac. J. Trop. Med. 2014, Vol. 7, pp. 390–393. DOI: 10.1016/S1995-7645(14)60062-6.
7. Atta H., El-Rehany M., Hammam O., et al. Mutant MMP-9 and HGF gene transfer enhance resolution of CCL4-induced liver fibrosis in rats: Role of ASH1 and EZH2 methyltransferases repression. PLoS One 2014, Vol. 9, pp. 1–11. DOI: 10.1371/journal.pone.0112384.
8. Zhang S. hong, Wen K. ming, Wu W., Li W. yan, Zhao J. nong. Efficacy of HGF carried by ultrasound microbubble-cationic nano-liposomes complex for treating hepatic fibrosis in a bile duct ligation rat model, and its relationship with the diffusion-weighted MRI parameters. Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol. 2013, Vol. 37, pp. 602–607. DOI: 10.1016/j.clinre.2013.05.011.
9. Apte S.S., Parks W.C. Metalloproteinases: A parade of functions in matrix biology and an outlook for the future. Matrix Biol. 2015, Vol. 44–46, pp. 1–6. DOI: 10.1016/j.matbio.2015.04.005.
10. Geervliet E., Bansal R. Matrix Metalloproteinases as Potential Biomarkers and Therapeutic Targets in Liver Diseases. Cells 2020, Vol. 9, DOI: 10.3390/cells9051212.
11. Beeravolu N., McKee C., Alamri A., et al. Isolation and characterization of mesenchymal stromal cells from human umbilical cord and fetal placenta. J. Vis. Exp. 2017, Vol. 2017, pp. 1–13. DOI: 10.3791/55224.
12. Faccioli L.A.P., Dias M.L., Paranhos B.A., dos Santos Goldenberg R.C. Liver cirrhosis: An overview of experimental models in rodents. Life Sci. 2022, Vol. 301, pp. 120615. DOI: 10.1016/j.lfs.2022.120615.
13. Nadobin D.S. The effect of bioregulators isolated from the liver and mammalian blood serum on the replacement regeneration of the mouse liver: abstract of the dissertation for the degree of PhD. Moscow State University 'M. V. Lomonosov', Moscow, 2016, pp. 110. (InRuss.).
14. Scholten D., Trebicka J., Liedtke C., Weiskirchen R. The carbon tetrachloride model in mice. Lab. Anim. 2015, Vol. 49, pp. 4–11. DOI: 10.1177/0023677215571192.
15. Higashi T., Friedman S.L., Hoshida Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. Adv. Drug Deliv. Rev. 2017, Vol. 121, pp. 27–42. DOI: 10.1016/j.addr.2017.05.007.
16. Gandhi C.R. Hepatic stellate cell activation and pro-fibrogenic signals. J. Hepatol. 2017, Vol. 67, pp. 1104–1105. DOI: 10.1016/j.jhep.2017.06.001.
17. Gough N.R., Xiang X., Mishra L. TGF- $\beta$  Signaling in Liver, Pancreas, and Gastrointestinal Diseases and Cancer. Gastroenterology 2021, Vol. 161, pp. 434-452.e15. DOI: 10.1053/j.gastro.2021.04.064.
18. Li Y., Fan W., Link F., Wang S., Dooley S. Transforming growth factor  $\beta$  latency: A mechanism of cytokine storage and signalling regulation in liver homeostasis and disease. JHEP Reports 2022, Vol. 4, pp.

100397. DOI: 10.1016/j.jhepr.2021.100397.

19. Ong C.H., Tham C.L., Harith H.H., Firdaus N., Israf D.A. TGF- $\beta$ -induced fibrosis: A review on the underlying mechanism and potential therapeutic strategies. *Eur. J. Pharmacol.* 2021, Vol. 911, pp. 174510. DOI: 10.1016/j.ejphar.2021.174510.

20. Puche J.E., Saiman Y., Friedman S.L. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Compr. Physiol.* 2013, Vol. 3, pp. 1473–1492. DOI: 10.1002/cphy.c120035.

21. Krohina N.B., Sheshenina A.V., Sazonov S.V., Serov N.A. The importance of histochemical and immunohistochemical etiological diagnosis of chronic viral hepatitis B. *Vestnik Ural'skoj mezhdicinskoj akademicheskoy nauki*=Bulletin of the Ural Medical Academic Science. 2009. №1 (23). С. 78-80

22. Pinheiro D., Dias I., Freire T., et al. Effects of mesenchymal stem cells conditioned medium treatment in mice with cholestatic liver fibrosis. *Life Sci.* 2021, Vol. 281, pp. 119768. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.119768.

23. Iwasawa T., Nojiri S., Tsuchiya A., et al. Combination therapy of Juzentaihoto and mesenchymal stem cells attenuates liver damage and regresses fibrosis in mice. *Regen. Ther.* 2021, Vol. 18, pp. 231–241. DOI: 10.1016/j.reth.2021.07.002.

24. Mazhari S., Gitiara A., Baghaei K., et al. Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and imatinib in a rat model of liver fibrosis. *Eur. J. Pharmacol.* 2020, Vol. 882, pp. 173263. DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.173263.

#### Authors

Dmitrij Ju. Grebnev

Doctor of Medical Sciences, Associate Professor, director of the Department of Pathological Physiology  
dr-grebnev77@mail.ru

Vasilii N. Slautin

Postgraduate student of the Department of Pathological Physiology  
vas-slautin@yandex.ru

Irina Ju. Maklakova

Doctor of Medical Sciences, Associate Professor, head of the Department of Normal Physiology  
Makliu@mail.ru

Olga Yu. Beresneva

Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Associate Professor of Histology Department

Konstantin Yu. Konyshv

Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Associate Professor of Histology Department  
kon-konyshv@yandex.ru

Federal State Budget Educational Institution of Higher Education «Ural state medical university» of the Ministry of Health of the Russian Federation

3 Repin str. Yekaterinburg Russian Federation 620028