

УДК 612.35.08

Гастроинтестинальные миофибробласты — роль в регуляции физиологической активности и репарации желудочно-кишечного тракта

Э.Ф. Баринов, О.Н. Сулаева

(Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького)

Gastrointestinal myofibroblasts: role in regulation of physiological activity and reparation of gastro-intestinal tract

E.F. Barinov, O.N. Sulayeva

Цель обзора. Проанализировать органоспецифические особенности гастроинтестинальных миофибробластов, функциональные свойства, роль в эмбриогенезе и заживлении язвенных дефектов стенки желудочно-кишечного тракта (ЖКТ).

Основные положения. Обсуждается морфология, маркёры, источники и стимуляторы формирования миофибробластов, их участие в формировании микрониши для эпителиальных стволовых клеток, кинетике покровного эпителия, ангиогенезе, контроле сосудистой проницаемости. Эти функции связаны с широким спектром секреторных продуктов миофибробластов, образующих молекулы базальной мембраны, компоненты матрикса и факторы роста. Интестинальные миофибробласты являются пейсмеккерами для гладких миоцитов ЖКТ, модулируют нейротрансмиссию, участвуют в модуляции иммунного ответа, играя критическую роль в репарации эрозий и язв ЖКТ.

Ключевые слова: миофибробласты, желудочно-кишечный тракт, язвы, эрозии, секреторные продукты миофибробластов.

The aim of review. To analyze organ-specific features of gastrointestinal myofibroblasts, functional properties, role in embryogenesis and healing of ulcers of *gastro-intestinal tract* (GIT).

Original positions. Morphology, markers, origin and stimulators of development of myofibroblasts, their involvement in formation of microniche for epithelial stem cells, kinetics of tegmental epithelium, angiogenesis, control of vascular permeability is discussed. These functions are related to wide spectrum of myofibroblast secretory products, producing molecules of basal membrane, components of matrix and growth factors. Intestinal myofibroblasts are pacemakers for smooth myocytes of GIT, they modulate neurotransmission, participate in modulation of immune response, playing a critical role in reparation of erosions and ulcers of GIT.

Key words: myofibroblasts, gastro-intestinal tract, ulcers, erosions, secretory products of myofibroblasts.

Баринов Эдуард Федорович — доктор медицинских наук, профессор, академик АН ВШ Украины, зав. кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии Донецкого национального медицинского университета. Контактная информация для переписки: barinoff@dsmu.edu.ua; Украина, 83003, г. Донецк, пр. Ильича, 16, Донецкий НМУ
Сулаева Оксана Николаевна — кандидат медицинских наук, доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Донецкого национального медицинского университета

Заживление дефектов стенки *желудочно-кишечного тракта* (ЖКТ) — эрозий, язв — представляет собой сложный процесс, направленный на ликвидацию повреждения. Его хронология и конечный исход зависят от эффективности реализации последовательных фаз, включая альтерацию и сосудистую реакцию, воспаление, ангиогенез, пролиферацию и дифференцировку клеток с закрытием дефекта грануляционной тканью, контракцию краев дефекта и эпителиальную реституцию, завершающуюся ремоделированием внеклеточного матрикса с приобретением дефинитивного паттерна межтканевых отношений [3, 10, 30]. При этом репаративные процессы, с одной стороны, жестко связаны с характером течения воспаления, а с другой, детерминируют сроки восстановления структурного гомеостаза и барьерных свойств *слизистой оболочки* (СО) [5, 34].

Несмотря на то, что репаративную регенерацию при *ульцерогенезе* считают стереотипным процессом, описанным в многочисленных отечественных и зарубежных публикациях [2, 7, 10], на сегодняшний день, по-прежнему, ряд вопросов остается открытым. Например, неясно, нарушение работы каких клеток играет ведущую роль в детерминации неэффективной репарации тканей, заведомо обладающих высоким регенераторным потенциалом. Среди прочих причин ключевым фактором *дизрегенерации* считается нарушение процесса формирования грануляционной ткани [11]. Ее развитие характеризуется не только образованием новых клеточных коопераций, но и появлением уникальной клеточной линии — *миофибробластов*, считающихся главными эффекторными клетками грануляций и стимуляторами эпителиальной реституции [9, 15, 32].

Морфологически *миофибробласты* были идентифицированы более 100 лет назад. Но лишь недавно установлена роль этого семейства клеток в паракринной регуляции фундаментальных биологических процессов [10, 20]. До сих пор мало известно об органоспецифических особенностях биологии гастроинтестинальных *миофибробластов*, возможностях регуляции количества и активности этой клеточной линии при *заживлении* язвенных дефектов СО, что и определило цель настоящего обзора.

Биология *миофибробластов*

К семейству *миофибробластов* традиционно относят разновидность стромальных клеток *мезенхимного* происхождения, классическим маркером которых является α -актин гладких *миоцитов* (α -SMA) [20]. Кроме того, *миофибробласты* экспрессируют мышечный *миозин*, что определяет *контрактивные* свойства этих клеток. Для дифференциальной диагностики с гладкими *миоцитами*

используют антитела против *c-kit*, экспрессию которого связывают с высокой чувствительностью данной популяции клеток к фактору *стволовых клеток* — СК (SCF) [34]. Для идентификации *миофибробластов* используются также менее известные, но специфические молекулы клеточной адгезии — *ОВ-кадгерин* и *Thy-1* [26].

Морфологически *миофибробласты* представляют собой звездчатые клетки с активным ядром. В цитоплазме развиты гранулярная *эндоплазматическая сеть* и комплекс *Гольджи*. Уникальной особенностью является степень развития и организация цитоскелета, представленного пучками параллельно расположенных микрофиламентов, получивших название *стрессорных волокон*. В их составе помимо цитоплазматического β -актина присутствует также α -SMA, количество которого прямо пропорционально локальному уровню *трансформирующего фактора роста* (TGF β) [11]. Подобно микрофиламентам гладких *миоцитов*, стрессорные волокна фиксируются к плотным тельцам цитоплазмы и плазмолеммы [21, 35].

Характерно, что *миофибробласт* работает не как отдельная независимая единица, а как часть системы, сопряженная с другими клетками и элементами матрикса. Это связано с особенностями контактов *миофибробластов* между собой и с *внеклеточным матриксом* (ВКМ). Так, отростки соседних клеток связаны между собой с помощью *целевидных соединений*, что обеспечивает формирование единой сети [20, 21]. Кроме того, *миофибробласты* активно регистрируют сигналы из внеклеточной среды посредством специализированных и уникальных по своей организации контактов — *фибронексусов*. В условиях *in vitro* аналогами этих контактов являются крупные суперзрелые зоны *фокальной адгезии* (supermature focal adhesions). На молекулярном уровне эти участки соответствуют зонам экспрессии *ОВ-кадгерина* (известного также как *кадгерин-11*) — трансмембранного рецептора адгезии, связанного с цитоплазматической стороны с пучками микрофиламентов [26]. Протяженность таких зон адгезии зависит от ригидности ВКМ и, в свою очередь, лимитирует силу натяжения, генерируемую *стрессорными волокнами*, фиксированными к плотным тельцам [31].

Изменение давления и химического состава ВКМ (например, при ферментной деградации плазминогеном) ведет к активации механо-сенситивных ионных каналов [21]. Это сопровождается входом Ca^{2+} , что вызывает деполяризацию плазмолеммы *миофибробластов*, сокращение и передачу сигналов по сети *миофибробластов*. Кроме того Ca^{2+} является универсальным мессенджером, активирующим такие трансдукторы, как протеинкиназа С и p38-МАРкиназа [25]. Последняя активируется также при стимуляции интегрин-

опосредованной стрессовой перцепции. К этому ведет потеря связи с лигандом $\alpha 5 \beta 1$ интегрина, цитоплазматический домен которого посредством винкулина, паксиллина и тензина связан со стрессорными волокнами [22]. Постулируется также важное значение киназы, ассоциированной с зонами фокальной клеточной адгезии Fak (focal adhesion kinase), обеспечивающей тирозиновое фосфорилирование белков цитоскелета и ряда трансдукторов [16]. В конечном итоге, основная роль цитоскелета миофибробласта сводится к механотрансдукции и формированию биохимических сигналов при участии тирозинкиназного и тирозинфосфатазного сигнального пути. А завершающим звеном трансдукции является активация p38-МАРкиназы, ведущая к усилению экспрессии факторов роста и секреторной активности миофибробластов [21, 31].

Классические представления о природе миофибробластов базируются на возможности их образования из разных источников. Каждая из линий прогениторов обладает уникальным набором антигенов на своей поверхности, позволяющим идентифицировать эти клетки и «отслеживать» их судьбу. На различных моделях острого повреждения ЖКТ показано, что альтерация сопровождается мобилизацией эндогенных костномозговых СК, инкорпорация которых в зону повреждения обеспечивает восстановление тканевых дефектов. Основополагающими индукторами мобилизации являются колониестимулирующие факторы — КСФ-Г, КСФ-ГМ, вызывающие выход в периферическую кровь широкого спектра стволовых клеток и клеток-предшественниц — гемопоэтических, стромальных, эндотелиальных [5, 26]. Стратегия стимуляции эндогенных СК рассматривается сегодня как перспективный инновационный метод стимуляции заживления язвенных дефектов в ЖКТ, однако требует тщательного теоретического обоснования и экспериментальной апробации. Ключевым источником формирования *de novo* линии миофибробластов считается стромальная костномозговая СК, выделенная из периферической крови и описанная как **циркулирующий фиброцит (ЦФ)**, экспрессирующий CD45, CD34, CXCR4 и коллаген I типа [8].

Условием участия ЦФ в репарации является не только мобилизация из костного мозга, но и успешная реализация процесса хоминга, обеспечивающегося за счет адгезии и миграции клеток в зону повреждения [21]. Однако парадокс ЦФ заключается в том, что данный вид предшественников является источником пополнения пула как миофибробластов, так и классических фибробластов. То есть дифференцировка ЦФ может происходить в разных направлениях. Вероятно, локальные факторы являются ведущими в детерминации и дифференцировке ЦФ.

Этот вопрос тем более интересен, что образование миофибробластов при повреждении может происходить из предсуществующих фибробластов [11]. Процесс активации дифференцировки фибробластов в миофибробласты происходит под влиянием цитокинов, продуцируемых локально клетками воспаления, резидентными клетками соединительной ткани, например при его опухолевой трансформации, а также при изменении химического состава матрикса [3, 34, 36]. Процесс дифференцировки фибробластов в миофибробласты является двухэтапным. *Первый этап* включает образование клетки-предшественницы — прото-миофибробласта, маркером которого является временно экспрессируемый N-кадгерин, — для заселения зоны повреждения [26]. Эта клетка имеет миграционный фенотип за счет *de novo* развития сократительных пучков цитоскелета. В условиях *in vivo* эти стрессорные волокна представлены главным образом β -цитоплазматическим актином и генерируют относительно слабые силы натяжения (тракции). Такие активированные фибробласты (прото-миофибробласты) формируются под действием стресса разной природы (механического, осмотического, оксидативного, дисрегуляторного) [23]. *Второй этап* дифференцировки предполагает превращение прото-миофибробласта в миофибробласт. Это специфический процесс, инициируемый активацией генетической экспрессии новой программы, маркером которой является α -SMA [25]. Индуктором этого превращения считается TGF β_1 , индизирующий прекращение экспрессии N-кадгерина, активирующий экспрессию α -SMA и ОБ-кадгерина, принимающих участие в формировании фибронексусов [26]. Немаловажное значение имеет присутствие в матриксе фибронектина и фактора растяжения ткани.

Не менее важным источником образования миофибробластов являются перициты сосудов микроциркуляторного русла [21]. Эти клетки расположены в дубликатуре базальной мембраны (БМ) гемокапилляров и венул, имеют развитый актиновый цитоскелет, связаны с эндотелиоцитами посредством щелевидных контактов. Использование данного источника предопределяет параллельное участие в репаративном процессе стромальных и эндотелиальных клеток [11]. Действительно, в ряде работ и собственных исследованиях доказана солокализация миофибробластов с сосудами микроциркуляторного русла, показана синхронизация активации ангиогенеза и реакции миофибробластов [10]. Тем более, что условием включения в репаративный процесс указанной клеточной линии является дезорганизация БМ, наблюдаемая при повреждении, активации пролиферации и миграции эндотелиальных клеток в ходе неоваскуляризации [15].

Ассоциация миофибробластов с эндотелием сосудов и их БМ в слизистых оболочках определяет выполнение важнейшей морфогенетической роли данной линии клетки в новообразовании и ремоделировании микроциркуляторного русла зоны повреждения, регуляции сосудистой проницаемости. Существует также точка зрения, о возможности взаимного превращения эндотелиальных клеток в миофибробласты [18]. Условием такой трансформации является длительная экспозиция с провоспалительными цитокинами — ФНО α (50 нг/мл) и ИЛ-1 β (10 нг/мл) [32]. Аналогичная трансдифференцировка происходит при развитии фиброза сердца, легких, почек и печени за счет эпителио-мезенхимальной трансформации [20, 29]. Приведенные данные отражают не только полиморфность происхождения, но и непостоянство популяции миофибробластов.

Согласно классическим представлениям, функциональная роль миофибробластов состоит исключительно в реализации реакции на повреждение. Однако при этом настораживает уникальный спектр функциональных возможностей и секреторных продуктов рассматриваемой линии клеток. Так, миофибробласты способны продуцировать ряд ключевых компонентов ВКМ, к которым относятся коллагены I, III, V, VII типов [20]. Доказана возможность продукции миофибробластами также компонентов БМ — коллагена IV типа и ламинина [29]. Кроме того, данная линия клеток продуцирует широкий спектр сульфатированных протеогликанов матрикса и БМ (в частности, декорин, перлекан и нидоген), влияющих на пролиферативные и миграционные способности клеток соединительной ткани и эпителия [6, 34]. Важным продуктом секреции миофибробластов является фибронектин и тенасцин-С, экспрессия которого в физиологических условиях характерна только для эмбрионального морфогенеза, а в зрелом организме ассоциирована лишь с репаративным процессом [3, 35]. Тенасцин-С привлекает фибробласты и, как и фибронектин, стимулирует их дифференцировку в миофибробласты при повреждении. Помимо компонентов ВКМ миофибробласты продуцируют также множество *металлопротеиназ* (ММП) и их тканевых ингибиторов (ТИМР), играющих существенную роль в ремоделировании матрикса, регуляции миграционной активности клеток, канцерогенезе [7, 13]. Среди ММП миофибробластов известны: коллагеназы (ММП-1, ММП-8, ММП-13, ММП-18), желатиназы (ММП-2), стромелизин (ММП-3, ММП-7, ММП-10, ММП-11), эластаза (ММП-12), мембранные типы (ММП-14, 15, 16, 17, 24, 25) и другие (ММП-19, 20, 23, 26, 27, 28) [17, 21, 34].

В реализации репарации и эпителиальной реституции ведущую роль играет продукция миофибробластами уникального спектра регу-

ляторов, включая эпиморфин, простагландины, оксид азота, трансформирующие факторы роста (TGF) — TGF α , TGF β , эпидермальный фактор роста (EGF), кислый и основной факторы роста фибробластов (*a*FGF и *b*FGF), фактор роста гепатоцитов (HGF), фактор роста кератиноцитов (KGF), инсулиноподобный фактор роста ILGF-I [20, 21]. Группу веществ, продуцируемых миофибробластами, и регуляторов, контролирующих этот процесс, можно пополнять бесконечно, однако это не приблизит нас к пониманию механизмов заживления язвенных дефектов в ЖКТ и феномену дизрегенерации. При анализе заживления дефектов СО важно помнить о том, что эффективная репарация предусматривает не только заполнение матриксом дефекта стенки ЖКТ и эпителизацию поверхности, но и восстановление пространственной организации микроциркуляторного русла, архитектуру клеток и ВКМ, органо- и тканеспецифическую дифференцировку эпителиоцитов и воссоздание рельефа слизистой оболочки, уникального для разных отделов ЖКТ. Здесь мы подходим к эпицентру настоящего обзора — постулату о наличии постоянных (резидентных) миофибробластов, являющихся хранителями генетической программы паттерна развития органа или его части.

Роль миофибробластов в формировании микроокружения для эпителиальных стволовых клеток ЖКТ

В качестве отправной точки в обсуждении данной концепции приведем результаты блестящего исследования В. Hafften, выполненного более 25 лет назад и открывшего уникальные свойства миофибробластов ЖКТ [21]. Ученый продемонстрировал, что интестинальные миофибробласты, выделенные из собственной пластинки СО, как и клетки интестинальной мезенхимы, индуцируют развитие энтодермы. Имплантация клеток линии типичных циркулирующих фиброцитов (выделенных из периферической крови или костного мозга) в фетальную энтодерму приводила к формированию глубоких крипт за счет усиления пролиферации эпителия. В отличие от этого, культивирование кишечной энтодермы с миофибробластами вело в большей мере к дифференцировке, чем к пролиферации эпителиоцитов — энтодерма формировала ворсинки с дифференцированными энтероцитами, эндокринными и бокаловидными клетками.

Целенаправленные исследования на предмет присутствия и роли миофибробластов в ЖКТ показали наличие нескольких постоянных пулов этих клеток у здоровых взрослых индивидуумов. В слизистой оболочке органов ЖКТ миофибробласты обнаружены преимущественно в

зоне локализации эпителиальных стволовых клеток [3, 19]. Сначала были описаны перикрипальные миофибробласты. Затем аналогичные клетки обнаружены в желудке, где они формируют муфту вокруг перешейков желез. Интересно, что такая закономерность была предвидена отечественным ученым В.Г. Гаршиным более 70 лет назад. Занимаясь проблемами воспалительных и неопластических заболеваний желудка и кишки, В.Г. Гаршин предположил, что зоны расположения эпителиальных СК — дно желудочных ямок/перешейков желез и дно кишечных крипт — окружены уникальными клетками соединительной ткани, обеспечивающими контроль их самоподдержания, пролиферации и дифференцировки в определенные клеточные типы [2]. Позднее эта гипотеза была подтверждена и детализирована благодаря работам в сфере генетики и молекулярной биологии, продемонстрировавшим, что важнейшей клеткой микроокружения стволовой эпителиальной клетки ЖКТ является миофибробласт [21].

Действительно, доказано, что миофибробласты формируют микронишу для эпителиальных СК, регулируя их самоподдержание, выживание и пролиферацию [10]. Они обеспечивают нечувствительность к антиростовым сигналам и обладают способностью блокировать апоптоз. Данный феномен связывают с продукцией миофибробластами специфического спектра регуляторов (факторов роста и сигнальных молекул), включая фактор роста гепатоцитов, фактор роста кератиноцитов, другие сигнальные молекулы (APC, Tcf-4, Cdx-1, Cdx-2), играющие важную роль в биологии СК [3].

Кроме того, миофибробласты оказывают стимулирующее влияние на пролиферацию прогениторов покровного эпителия в ответ на повреждение, что создает условия для активного участия миофибробластов в заживлении дефектов СО, стимулируя процесс эпителиальной реституции. Факторы, принимающие участие в реституции: HGF, KGF (FGF-7, FGF-10), CXCL-12 (stromal derived factor 1 α), простагландины [21]. При этом между эпителием и миофибробластами формируются уникальные взаимодействия, основанные на взаимной индукции. Так, миофибробласты продуцируют HGF, KGF, тогда как рецепторы к ним (c-met — к HGF и FGFRIIIb — к KGFs) экспрессируются исключительно в эпителиальных клетках [9]. С другой стороны, TGF β и трефоилловые пептиды, вызывающие активацию миофибробластов, продуцируются эпителиальными клетками [5]. Благодаря таким взаимодействиям миофибробласты являются мощными стимуляторами пролиферации прогениторных клеток эпителия, обеспечивая ускорение их миграции и закрытие дефекта СО (эрозии, язвы) монослоем эпителиальных клеток. С активностью

миофибробластов связывают также появление особой клеточной линии, возникающей при ulcerогенезе — ulcer-associated cell lineage [10]. Однако как меняется количество и расположение миофибробластов в слизистой оболочке при остром повреждении и развитии хронического воспалительного процесса, известно мало. Хотя очевидно, что ответ на данный вопрос и выяснение механизмов регуляции количественных и качественных характеристик миофибробластов помогли бы раскрыть загадку патогенеза язвообразования и изыскать пути профилактики прогрессирования и осложнения язвенного процесса.

Пейсмеккерная активность миофибробластов

Помимо группы миофибробластов, расположенных в презумптивных зонах СО желудка и кишки в ассоциации со стволовыми клетками эпителия, и репаративного пула, временно функционирующего при повреждении слизистой оболочки, в ЖКТ обнаружены и другие функциональные типы миофибробластов. Более 40 лет назад Paskal, Кауе и Lane описали наличие в собственной пластинке толстой кишки прослойки фибробластов, находящихся в тесной связи с эпителием [20]. Аналогичные клетки были найдены в желудке, тонкой кишке и желчном пузыре. 10 лет спустя были обнаружены миофибробласты, расположенные в мышечной и подслизистой оболочках ЖКТ. Анализ свойств миофибробластов разной локализации привел к выделению двух постоянных популяций — **интерстициальные и субэпителиальные миофибробласты** (ИМб и СЭМб). Эти две популяции клеток имеют одинакового предшественника и существуют в виде синцития — клетки звездчатой формы связаны в единую систему с помощью щелевидных соединений [26].

ИМб расположены в подслизистой основе и мышечной оболочке кишки в ассоциации со слоем гладких миоцитов. Доказана роль ИМб как электрических пейсмеккеров, которые контролируют подвижность ЖКТ, и эта концепция была многократно доказана разными авторами [9, 19, 26]. Характерно, что ИМб располагаются только в определенных регионах ЖКТ. Классически они локализируются в межмышечном пространстве между продольным и циркулярными слоями мышечной оболочки в желудке, тонкой и толстой кишке. Кроме того, они могут находиться в подслизистой основе. Формирование данной популяции клеток происходит при участии фактора стволовых клеток (SCF). Плазмолемма этих клеток формирует многочисленные кавеолы и богата рецепторами к многочисленным системным и локальным регуляторам, **ионными каналами и переносчиками**. Они чувствительны к атриаль-

ному натрийуретическому пептиду, простагландинам, ацетилхолину, гистамину, ангиотензину, эндотелину-1 и пр.

Основной смысл такой специализации заключается не столько в регуляции сократительной активности клеток, сколько в появлении уникальных свойств линии миофибробластов. Так, доказано, что ИМб являются пейсмеккерами для гладких миоцитов мышечной оболочки ЖКТ. В кишке млекопитающих ИМб генерируют волны электрической активности с характерной частотой — от 6 до 12 циклов за минуту в зависимости от сегмента [19]. Это вызвано осцилляциями мембранного потенциала за счет меняющейся проводимости для Ca^{2+} в связи с активацией и закрытием вольтаж-зависимых Ca^{2+} -каналов. Кроме того, миофибробласты могут модулировать прохождение электрических сигналов иной природы, что обусловлено не только наличием многочисленных щелевидных соединений между собой и с гладкими миоцитами, но и способностью модулировать нейротрансмиссию. Как оказалось, ИМб расположены между нейральными варикозами и гладкими миоцитами, что обеспечивает им роль посредников в нейромышечных взаимодействиях [26]. ИМб не только отвечают на нейротрансмиттеры, но и сами продуцируют ацетилхолин, оксид азота, ВИП, АТФ и субстанцию Р [20].

Роль миофибробластов в регуляции кишечной моторики доказана в серии экспериментальных исследований. Так, нейтрализация c-kit с помощью введения специфических антител (АСКII) новорожденным мышам приводила к снижению активности мышечной оболочки ЖКТ. Не менее интересные данные получены на мутантной линии животных со сниженной экспрессией c-kit [35]. У таких мышей наблюдались нарушения ритмических сокращений мышечной оболочки кишки, а также аномалии развития кишечника, включая мегаколон.

Субэпителиальные миофибробласты кишки — регуляторы дифференцировки и транспортной активности клеток

Не менее интересной и специфичной линией клеток являются СЭМб, расположенные в собственной пластинке вблизи покровного эпителия. Эти клетки сопровождают систему крипта—ворсинка на всем протяжении. Они обнаружены под эпителием в ЖКТ начиная от пищевода и заканчивая прямой кишкой [1, 19, 20]. СЭМб располагаются преимущественно вблизи крипт, в меньшем количестве у поверхности СО толстой кишки и в ворсинках тонкой кишки. Все они объединены в синцитий, расположенный в собственной пластинке, формируя единую систему. Кроме того, СЭМб контактируют с перипитами сосудов микроциркуляторного русла. В зоне таких межклеточных соединений выявлены щелевидные и

адгезивные контакты. Ультраструктурные исследования продемонстрировали наличие также контактов СЭМб с нервными терминалями, содержащими синаптические пузырьки [26]. Кроме того, установлено, что в ответ на освобождение ацетилхолина миофибробласты продуцируют цитопротектор, вазодилатор и усилитель продукции слизи и бикарбонатов — простагландин E_2 [19].

Есть доказательства того, что субэпителиальные миофибробласты могут мигрировать вдоль оси крипта—ворсинка. Их паттерн включает пролиферацию, миграцию и дифференцировку. Использование меченого [^3H]-тимидина у кроликов показало, что перикрипальные миофибробласты делятся, в течение 2–4 дней мигрируют к верхушке ворсинок, двигаясь вдоль БМ, а затем исчезают, подвергаясь либо эксфолиации, либо апоптозу [11]. При этом меняются их морфологические характеристики. Так, перикрипальные миофибробласты — дискоидной формы, но по мере движения в ворсинку они становятся звездчатыми. Предполагается, что движущими силами для миграции миофибробластов являются сигналы из эпителия.

Тесным взаимодействиям между эпителием и миофибробластами кишки способствует и выраженная структурная ассоциация. Описаны уникальные контакты субэпителиальных миофибробластов с базальной мембраной эпителия и эндотелия. В ворсинках отростки миофибробластов связаны, с одной стороны, с сосудистой стенкой, а с другой — с эпителиальной БМ [20]. Базальная мембрана сосудистого эндотелия, по крайней мере в верхних $2/3$ ворсинки, имеет многочисленные фенестры, через которые могут проходить отростки миофибробластов. Миофибробласты пронизывают и субэпителиальную пластинку ретикулярных волокон, которая также содержит фенестры для миграции лимфоцитов и макрофагов. Миофибробласты формируют на ее поверхности отростки в виде ножек, подобно подоцитам в почечном тельце. Открытие данного феномена послужило основанием для предположений о роли миофибробластов в транспорте воды и электролитов.

Помимо этого предполагается роль миофибробластов в модуляции дифференцировки эпителия посредством факторов роста и компонентов БМ. Показано, что субэпителиальные миофибробласты секретируют коллаген IV типа, декорин, синдекан, ламинин и нидоген, а также широкий спектр гепатрансульфат протеогликанов. Последние играют важную роль в эмбриональном развитии, являясь корецепторами к $\text{TGF}\beta$ и другим представителям гепарин-связанных факторов роста — VEGF, HGF, ILGF-2, Wnts, Shh, FGF-1, FGF-2 [21].

Одним из регуляторов дифференцировки кишечных энтероцитов являются морфогенети-

ческие белки кости (BMP) — BMP-2 и BMP-4. В эмбриогенезе BMP-2 и -4 влияют на реализацию сигнального пути энтодермального фактора Hedgehog (Shh, Ihh) в окружающей мезодерме, регулируя ее развитие. На сегодняшний день предполагается, что Shh не только регулирует радиальную дифференцировку мезодермы путем индукции собственной пластинки и подслизистой основы, но и модулирует (супрессирует) развитие гладких миоцитов и нейрональных клеток [21, 35]. В то же время экспрессия BMP-4 регулируется эпиморфином, продуцируемым миофибробластами.

Кроме того, модулирующее влияние на развитие эпителия оказывают такие компоненты БМ, как декорин и синдекан. Декорин, относящийся к семейству секретируемых хондроинтин сульфат протеогликанов, помимо связи с представителями TGF β -семейства и регуляции их биологической доступности, может взаимодействовать с рецепторами к EGF, регулируя таким образом пролиферативный ответ эпителиоцитов [20]. Синдекан, наряду с другими компонентами и факторами роста, принимает участие в выживании и росте эпителия. Его экспрессия находится под контролем транскрипционного фактора FoxL1, а воздействие на эпителиоциты СО ЖКТ реализуется путем модификации Wnt-сигнализации [5, 19].

Благодаря таким анатомическим и структурным связям, а также широкому спектру морфогенов СЭМБ могут выполнять важную роль в контроле дифференцировки клеток покровного эпителия, причем реализация этого процесса после повреждения носит общие черты с таковой при эмбриогенезе. В конечном итоге, парадигма миофибробластов вписывается в теорию повторения ключевых механизмов эмбрионального гистогенеза в процессе репаративной регенерации [10]. Об этом свидетельствуют не только индуктивные способности, но и продукция миофибробластами таких «сугубо эмбриональных» компонентов ВКМ, как тенасцин.

Роль миофибробластов в морфогенезе ЖКТ

Детальное изучение роли миофибробластов в эмбриональном развитии показало, что эти клетки являются активными и специфическими участниками морфогенеза пищеварительного канала. Развитие слизистой оболочки кишки включает два этапа: 1) органогенез (морфогенез), во время которого происходит взаимодействие между энтодермой и мезенхимой с формированием трубки с разными регионами — передняя кишка, средний и задний отдел и последующая дифференцировка крипт и ворсинок; 2) цитодифференцировка эпителиальных СК в четыре ключевых типа (энтероциты, бокаловидные и эндокринные клетки,

клетки Панета) [5]. Оба этапа являются сложными и включают клеточную адгезию, пролиферацию, миграцию, дифференцировку и, наконец, апоптоз.

На первом этапе роль миофибробластов заключается в формировании проксимально-дистального градиента. Данный механизм связывают с двухфазной индукцией. На этом этапе **энтодерма с участием Shh-сигнализации индуцирует развитие мезенхимы** и в ней миофибробластов. Индуцирующее влияние энтодермы обеспечивает привлечение мезенхимы путем стимуляции экспрессии транскрипционного фактора KLF5 (Kruppel-like). Его экспрессия стимулирует А-цепь фактора роста тромбоцитарного происхождения (PDGF) и экспрессию α -SMA в мезенхиме развивающейся кишки, что послужило основанием для вывода о роли раннего формирования пула миофибробластов в морфогенезе слизистой оболочки ЖКТ [35].

На следующем этапе происходит **мезенхимозителлиальная индукция**, детерминирующая специфику формирующегося рельефа, тип и клеточный состав эпителия. Этот процесс осуществляется при участии регуляторов транскрипции (FoxL1, Nkx2), семейства гомеобоксных генов HOX, компонентов ВКМ (тенасцин, синдекан и другие протеогликаны) и секретируемых факторов роста (FGFs, HGF, KGF, TGF), спектр которых во многом сходен с таковым для миофибробластов зрелой кишки и кожи при репарации после повреждения [5, 10, 21]. В постнатальном периоде формирование специфического клеточного состава эпителия ЖКТ в разных регионах после повреждения связывают с выделением миофибробластами разного количества фактора роста гепатоцитов, TGF и эпиморфина [19]. Имея неограниченную способность к репликации и обладая высокой способностью к инвазии и миграции, миофибробласты могут также индуцировать и/или поддерживать неопластический процесс [2, 3, 35].

Регуляция популяции миофибробластов ЖКТ

К ключевым индукторам формирования миофибробластов после повреждения относятся гепарин (антикоагулянт), тромбин (через PAR — протеиназа-активируемые рецепторы). Данный процесс напрямую зависит от уровня TGF β , bFGF и пр. [12, 27]. Кроме того, мощными индукторами пополнения пула миофибробластов считаются ангиотензин II и эндотелин-1, которые, однако, могут реализовать свои эффекты не напрямую, а посредством активации экспрессии TGF β [32, 33]. При этом важно отметить, что запуск программы формирования миофибробластов связан с *Serum response factor* (SRF) [14, 15]. Это транскрипци-

онный фактор, индуцируемый факторами роста. Его активность значительно повышается при фосфорилировании в области 103-го остатка серина N-терминального отдела вблизи ДНК-связывающего домена. Описание экспрессии SRF было опубликовано около 20 лет назад, но роль указанного фактора в программе заживления долгое время оставалась неясной. Ряд авторов считает, что активация этой программы происходит при контакте с сывороткой крови клеток, которые в нормальных условиях такого контакта не имеют (например, эпителия) [13]. Данная программа включает не просто митогенную стимуляцию, но и специфический паттерн морфогенетических событий, обеспечивающих фазное течение раневого процесса. Включение сывороточного фактора ведет к активации более 300 генов, т. е. практически 1% от всего генома. Среди них — гены немедленного ответа (такие, как *c-fos* и *cyr61*), важные для процесса заживления ран. Другая группа включает гены, ассоциированные с поддержанием мышечного фенотипа (eg, *smooth muscle α -actin* и *smoothelin*), являющиеся структурными белками мышечных клеток и миофибробластов. SRF необходим также для ангиогенеза, индуцируемого VEGF [15].

Наиболее мощным стимулятором образования миофибробластов является TGF β [11]. Этот мультифункциональный пептид рассматривается сегодня как ключевой стимулятор фиброгенеза. Доказано, что TGF β_1 является мощным индуктором дифференцировки миофибробластов как *in vivo*, так и *in vitro*. На 6-й день заживления в зоне повреждения СО желудка уровень данного фактора роста повышается в 38 раз, что морфологически ассоциировано с образованием грануляционной ткани [10]. Известно, что TGF β_1 индуцирует экспрессию SRF. Классическая система сигнализации TGF β_1 включает активацию семейства транскрипционных факторов Smad [22]. Ведущая роль отводится активации Smad3 и Smad2. Альтернативная активация SRF связана с работой ILK-сигнализации (интегрин-связанная киназа, относящаяся к семейству серин-треониновых киназ) [25].

Среди механизмов стимулирующего воздействия TGF β на экспрессию SRF обсуждается роль казеин-киназы (casein kinase II) и киназы активирующего белка MAP-киназы (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase). Они могут фосфорилировать SRF, однако их роль в формировании пула миофибробластов не доказана. Установлено, что локальная инъекция TGF β_1 усиливает заживление желудочных язв [21, 32], хотя другие авторы наблюдали противоположный эффект [25]. Очевидно, что данные противоречия могут быть связаны с использованием TGF β в разные сроки раневого процесса, разворачивающегося в СО желудка после повреждения. Так, воспаление и ИЛ-1 ингибируют TGF β -индуциру-

емую активацию образования миофибробластов [18, 20]. Другой провоспалительный цитокин Т-клеточного ответа — ИФН γ — также снижает экспрессию α -SMA [36]. Причем его влияние связывают с блоком Smad3-сигнализации, активируемой TGF β [24]. Кроме того ИФН γ повышает экспрессию Smad7, являющегося негативным модулятором эффектов Smad3 [25]. При этом стоит отметить, что изолированная и не связанная с TGF β инкубация фибробластов и эндотелиоцитов с ИЛ-1 β является стимулирующим фактором их трансформации в миофибробласты [18].

В формировании грануляционной ткани и стимуляции пула миофибробластов предполагается также роль ИЛ-6 [20]. У мышей с нокаутированным геном ИЛ-6 имеет место нарушение процесса заживления язв, связанное с дефектом образования миофибробластов, нарушением экспрессии α -SMA и ограничением стимуляции SRF при неизменном уровне TGF β . Рекомбинантный ИЛ-6 повышал экспрессию SRF и транскрипцию α -SMA в культуре фибробластов от ИЛ-6-нулевых мышей даже при отсутствии TGF β_1 [30].

На экспериментальной модели язвенного поражения желудка с использованием генной терапии было показано, что активация экспрессии SRF при заживлении язвенного дефекта стимулирует восстановление эпителия и гладких миоцитов, сопровождаясь подъемом уровней HGF и KGF — продуктов секреторной активности миофибробластов [3, 10]. Причем важным регулятором подъема концентрации HGF в дефекте слизистой оболочки при реэпителизации являются простагландины. Использование индометацина и селективного ингибитора ЦОГ-2 (NS-398) вело к снижению уровня ПГЕ2, а также к ограничению продукции VEGF, HGF и других факторов роста, продуцируемых миофибробластами. В то же время ИЛ-1 β стимулировал активность ЦОГ-2, усиливая продукцию ПГЕ2 и простагличина миофибробластами в зоне заживления язвы [30].

Гораздо большую определенность в вопросе регуляции пула миофибробластов можно получить при анализе эффектов факторов роста и цитокинов с учетом морфогенеза клеток, которые проходят фазу пролиферации, миграции, дифференцировки, секреторной активности и апоптоза. При таком подходе было выяснено, что мощными стимуляторами митоза миофибробластов являются EGF, bFGF, ILGF-I, ILGF-II [34]. В отличие от этого индуцируют дифференцировку миофибробластов — TGF β , CTGF (нисходящий медиатор TGF β), фибронектин и факторы механического напряжения [11, 22]. На популяцию интестинальных миофибробластов могут влиять и другие факторы тромбоцитарного происхождения. Среди них в первую очередь необходимо отметить роль PDGF. Семейство PDGF (AA, AB, BB, CC, DD) и их рецепторы ($\alpha\alpha$, $\beta\beta$, $\alpha\beta$) явля-

ются ключевыми регуляторами подвижности и пролиферации интестинальных миофибробластов не только в процессе заживления дефектов СО при ulcerogenesis, но и в эмбриогенезе [17]. Так, делеция генов PDGFA и рецепторов PDGFR α ведет к формированию аномальной архитектуры ворсинок тонкой кишки.

Не менее интересные данные получены в отношении влияния на репаративные процессы факторов свертывания крови — тромбина и тромбопластина [12, 27]. Последний может аккумулироваться в тромбоцитах, моноцитах и эозинофилах крови, а также продуцироваться эндотелием и периваскулярными фибробластами. Эффекты тромбина и тромбопластина реализуются через систему протеиназа-ассоциированных рецепторов, которые экспрессируются на тромбоцитах, лейкоцитах, эндотелии, стромальных клетках и покровном эпителии ЖКТ [28]. Помимо обеспечения эффективного гемостаза, PAR являются важными посредниками в стимуляции воспаления, ангиогенеза и репарации [27, 33]. Причем реализация этих процессов невозможна без участия PAR, о чем свидетельствуют данные экспериментальных исследований на мышах. Результатом создания трансгенной линии мышей PAR $^{-/-}$ /PAR $^{-/-}$ стала гибель эмбрионов на ранних стадиях эмбриогенеза вследствие блока ангиогенеза и гистогенеза периваскулярных тканей [27].

Доказано также мощное стимулирующее воздействие тромбина на клетки мезенхимного про-

исхождения. Известно, что тромбин стимулирует синтез ДНК и ускоряет деление фибробластов, миофибробластов, гладких миоцитов и эндотелиоцитов за счет активации серин-треониновых киназ, ассоциированных с PAR-1. Помимо прямого действия на клеточное деление и рост, тромбин оказывает опосредованное влияние за счет усиления экспрессии промитогенов, включая PDGF [34]. Кроме того, тромбин активирует экспрессию рецепторов для VEGF — Flt и повышает экспрессию TGF β , необходимого для развития грануляционной ткани и заполнения язвенного дефекта [29]. Это может обеспечивать синергизм в реализации процессов гемостаза и репарации при язвенном кровотечении, однако требует дальнейших исследований.

Переоценить значение миофибробластов в регуляции функционирования ЖКТ сложно. Они являются связующим звеном между восстановлением и репарацией, выполняют роль носителей программы развития (пространственно-хронологического морфогенеза тканей), восстановления рельефа органов, регуляции органоспецифической дифференцировки клеток разных линий, необходимой для полноценного возобновления функций после повреждения. Раскрытие загадки миофибробластов позволит подойти к вопросу не только об управлении процессом репарации, но и возможностях реконструкции внешних и внутренних покровов после необратимых повреждений.

Список литературы

1. Аруин Л.И., Капуллер Л.Л., Исаков В.А. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника. — М.: Трида-Х, 1998. — 496 с.
2. Гаршин В.Г. Воспалительные разрастания эпителия, их биологическое значение и отношение к проблеме рака. — М.—Л.: Медгиз, 1939. — 129 с.
3. Кононов А.В. Воспаление как основа *Helicobacter pylori*-ассоциированных болезней // Арх. патол. — 2006. — Т. 68, вып. 5. — С. 1–6.
4. Кононов А.В. Цитопротекция слизистой оболочки желудка: молекулярно-клеточные механизмы // Рос. журн. гастроэнтерол. гепатол. колопроктол. — 2006. — Т. 16, № 3. — С. 12–16.
5. Молекулярные основы регенерации желудочно-кишечного эпителия // Рос. журн. гастроэнтерол. гепатол. колопроктол. — 2004. — Т. 14, № 5. — С. 4–8.
6. Федоров Д.Н. Морфологическая и иммуногистохимическая характеристика репаративных процессов в длительно не заживающих ранах // Арх. патол. — 2002. — Т. 64, № 1. — С. 8–11.
7. Циммерман Я.С. Проблема хронического гастрита // Клин. мед. — 2008. — № 5. — С. 13–21.
8. Abe R., Donnelly S.C., Peng T. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites // J. Immunol. — 2001. — Vol. 166. — P. 7556–7562.
9. Aguilar D., Skrabanek L. Beyond tissue Info: functional prediction using tissue expression profile similarity searches // Nucleic Acids Res. — 2008. — Vol. 36, N 11. — P. 3728–3737.
10. Basson M.D. Gut mucosal healing: is the science relevant? // Am. J. Pathol. — 2002. — Vol. 161. — P. 1101–1105.
11. Brenmoehl J., Miller S.N. Transforming growth factor-beta 1 induces intestinal myofibroblast differentiation and modulates their migration // World J. Gastroenterol. — 2009. — Vol. 15, N 13. — P. 1431–1442.
12. Butenas S., Bouchard B.A. Tissue factor activity in whole blood // Blood. — 2005. — Vol. 105, N 7. — P. 2764–2770.
13. Chai J., Baatar D., Tarnawski A. Serum response factor promotes re-epithelialization and muscular structure restoration during gastric ulcer healing // Gastroenterology. — 2004. — Vol. 126. — P. 1809–1818.
14. Chai J., Chow J. A critical role of serum response factor in myofibroblast differentiation during experimental Oesophageal ulcer healing in rats // Gut. — 2007. — Vol. 56. — P. 621–630.
15. Chai J., Tarnawski A.S. Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing // J. Physiol. Pharmacol. — 2002. — Vol. 53. — P. 147–157.
16. Ding Q., Gladson C.L., Wu H., Hayasaka H. Focal adhesion kinase (FAK)-related non-kinase inhibits myofibroblast differentiation through differential MAPK activation in a FAK-dependent manner // J. Biol. Chem. — 2008. — Vol. 283. — P. 26839–26849.
17. Ding Q., Stewart J.Jr. The pattern of enhancement of Src kinase activity on platelet-derived growth factor stimulation of glioblastoma cells is affected by the integrin engaged // J. Biol. Chem. — 2003. — Vol. 278. — P. 39882–39891.

18. *Fiuza C., Bustin M., Talwar S.* Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells // *Blood*. — 2003. — Vol. 101. — P. 2652–2660.
19. *Flemström G., Sjöblom M.* Epithelial cells and their neighbors. II. New perspectives on efferent signaling between brain, neuroendocrine cells, and gut epithelial cells // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* — 2005. — Vol. 289. — P. 377–380.
20. *Gabbiani G.* Evolution and clinical implications of the myofibroblast concept // *Cardiovasc.* — 1998. — Vol. 38. — P. 545–548.
21. *Gabbiani G.* The biology of the myofibroblast // *Kidney Int.* — 1992. — Vol. 41. — P. 530–532.
22. *Garrett Q., Khaw P.T.* Involvement of CTGF in TGF-beta1-stimulation of myofibroblast differentiation and collagen matrix contraction in the presence of mechanical stress // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 2004. — Vol. 45. — P. 1109–1116.
23. *Grotendorst G.R., Duncan M.R.* Individual domains of connective tissue growth factor regulate fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation // *FASEB J.* — 2005. — Vol. 19. — P. 729–738.
24. *Gu L., Zhu Y.J., Guo Z.J.* Effect of IFN-gamma and dexamethasone on TGF-beta1-induced human fetal lung fibroblast-myofibroblast differentiation // *Acta Pharmacol. Sin.* — 2004. — Vol. 25. — P. 1479–1488.
25. *Harvey K.A., Paranaivitana C.N., Zaloga G.P.* Diverse signaling pathways regulate fibroblast differentiation and transformation through Rho kinase activation // *J. Cell. Physiol.* — 2007. — Vol. 211. — P. 353–363.
26. *Hinz B., Pittet P., Smith-Clerc J.* Myofibroblast development is characterized by specific cell-cell adherens junctions // *Mol. Biol. Cell.* — 2004. — Vol. 15. — P. 4310–4320.
27. *Hirano K.* The roles of proteinase-activated receptors in the vascular physiology and pathophysiology arteriosclerosis // *Thromb. Vasc. Biol.* — 2007. — Vol. 27. — P. 27–36.
28. *Holinstat M., Voss B., Bilodeau M.L.* Protease-activated receptors differentially regulate human platelet activation through a phosphatidic acid-dependent pathway // *Mol. Pharmacol.* — 2007. — Vol. 71. — P. 686–694.
29. *Kondo S., Kagami S., Urushihara M.* Transforming growth factor-beta1 stimulates collagen matrix remodeling through increased adhesive and contractive potential by human renal fibroblasts // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2004. — Vol. 1693. — P. 91–100.
30. *Martin G.R., Wallace J.L.* Gastrointestinal inflammation: A central component of mucosal defense and repair // *Exp. Biol. Med.* — 2006. — Vol. 231. — P. 130–137.
31. *Meyer-Ter-Vehn T., Gebhardt S., Sebald W.* p38 inhibitors prevent TGF-beta-induced myofibroblast transdifferentiation in human tenon fibroblasts // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 2006. — Vol. 47. — P. 1500–1509.
32. *Oberringer M., Meins C., Bubel M., Pohlemann T.* In vitro wounding: effects of hypoxia and transforming growth factor beta1 on proliferation, migration and myofibroblastic differentiation in an endothelial cell-fibroblast co-culture model // *J. Mol. Histol.* — 2008. — Vol. 39. — P. 37–47.
33. *Ott J.* Soluble tissue factor emerges from inflammation // *Circ. Res.* — 2005. — Vol. 96. — P. 1217–1218.
34. *Playford R.J., Ghosh S.* Cytokines and growth factor modulators in intestinal inflammation and repair // *J. Pathol.* — 2005. — Vol. 250. — P. 417–425.
35. *Powell D.W., Mifflin R.C.* Epithelial cells and their neighbors. I. Role of intestinal myofibroblasts in development, repair, and cancer // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* — 2005. — Vol. 289. — P. 2–7.
36. *Sobral L.M., Montan P.F., Martelli-Junior H., Graner E.* Opposite effects of TGF-beta1 and IFN-gamma on transdifferentiation of myofibroblast in human gingival cell cultures // *J. Clin. Periodontol.* — 2007. — Vol. 34. — P. 397–406.