

DOI: 10.15825/1995-1191-2020-3-134-142

К МЕХАНИЗМУ АКТИВАЦИИ ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В ПЕЧЕНИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ОБЩЕЙ РНК КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА

Н.А. Онищенко¹, Е.В. Фоменко¹, А.О. Никольская¹, З.З. Гоникова¹, М.Ю. Шагидулин^{1, 2}, М.В. Балясин², А.В. Ельчанинов³, В.И. Севастьянов¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

² ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Российская Федерация

³ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва, Российская Федерация

Цель – на модели обширной резекции печени (ОРП) изучить клеточные механизмы активации восстановительных процессов в печени при использовании общей РНК (оРНК) клеток костного мозга (ККМ).

Материалы и методы. Крыс-самцов породы Вистар (n = 80) с моделью ОРП (70%) разделили на 2 группы: группа 1 – контроль с однократным введением физиологического раствора и группа 2 – опытная с однократным введением оРНК в дозе 30 мкг/100 г веса животного. Контролировали в динамике биохимические показатели функции и массу печени, а также микроструктурные изменения гепатоцитов через 48 часов после ОРП, исследуя митотическую активность, экспрессию каспазы 9 и морфометрические показатели.

Результаты. Установлено, что в группе 2 по сравнению с группой 1 имеет место: более быстрая нормализация биохимических показателей (к 10–14-м суткам), более высокий митотический индекс гепатоцитов (23,45% против 5,37%), первоначально более резкое снижение, а затем более быстрое восстановление массы печени (к 10–12-м суткам против 18–20-х суток). В группах 1 и 2 выявлена практически тотальная экспрессия каспазы 9, в том числе в митотически делящихся гепатоцитах. В группе 1 выявлено уменьшение значений морфометрических показателей одно- и двухъядерных клеток, уменьшение количества двухъядерных гепатоцитов и увеличение общей плотности гепатоцитов по сравнению с интактной печенью. Внутривенное введение оРНК приводило к увеличению значений морфометрических показателей одноядерных гепатоцитов, не влияло на их количество, но увеличивало площадь ядер двухъядерных гепатоцитов по сравнению с контролем. **Заключение.** Доказанное свойство оРНК из ККМ одновременно поддерживать в клетках печени после ОРП процессы апоптоза и индуцировать митотическую активность свидетельствует о том, что оРНК способна на ранней фазе регенерационного процесса переключать активировавшийся апоптоз на пролиферацию клеток. Обнаруженный эффект может быть обусловлен наличием в составе оРНК регуляторных молекул РНК, в том числе многочисленных белок-некодирующих РНК.

Ключевые слова: клетки костного мозга, общая РНК, печень, экспериментальная модель, резекция, регенерация.

Для корреспонденции: Гоникова Залина Залимгериевна. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел. (966) 188-33-33. E-mail: zalina3392@gmail.com

Corresponding author: Zalina Gonikova. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation. Phone: (966) 188-33-33. E-mail: zalina3393@gmail.com

ACTIVATION OF REGENERATIVE PROCESSES IN THE LIVER WHEN USING CELL-BONE MARROW TOTAL RNA

N.A. Onishchenko¹, E.V. Fomenko¹, A.O. Nikolskaya¹, Z.Z. Gonikova¹, M.Yu. Shagidulin^{1, 2}, M.V. Balyasin², A.V. Elchaninov³, V.I. Sevastyanov¹

¹ Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

² Sechenov University, Moscow, Russian Federation

³ Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russian Federation

Objective: to study the cellular mechanisms of activation of regenerative processes in the liver when using total RNA (tRNA) of bone marrow cells (BMCs) based on an extended liver resection (ELR) model. **Materials and methods.** Male Wistar rats (n = 80) with ELR model (70%) were divided into 2 groups: group 1 (control group) had a single saline injection, while group 2 (experimental group) received a single tRNA injection at a 30 µg/100 g dose of animal weight. The biochemical parameters of liver function and weight were monitored over time. Also monitored were microstructural changes in hepatocytes 48 hours after ELR by examining mitotic activity, caspase-9 expression and morphometric parameters. **Results.** It was found that in group 2, in comparison to group 1, there was faster normalization of biochemical parameters (by 10–14 days), a higher mitotic index of hepatocytes (23.45% versus 5.37%), and initially sharper decrease and then faster recovery of liver mass (by 10–12 days versus 18–20 days). Both groups showed almost total expression of caspase-9, including in mitotically splitting hepatocytes. Group 1 demonstrated decreased values of morphometric parameters of single and binuclear cells, decreased number of binucleated hepatocytes and increased total density of hepatocytes as compared to the intact liver. Intraperitoneal administration of tRNA increased morphometric parameters of mononuclear hepatocytes, did not affect their number, but increased the area of the nuclei of binuclear hepatocytes as compared to the control group. **Conclusion.** The proven capability of cell-bone marrow total RNA to simultaneously support apoptosis in liver cells after ELR and induce mitotic activity indicates that tRNA can switch activated apoptosis to cell proliferation at the early phase of the regenerative process. This effect may be due to the presence of regulatory RNA molecules in tRNA, including numerous non-coding RNAs.

Keywords: bone marrow cells, total RNA, liver, experimental model, resection, regeneration.

ВВЕДЕНИЕ

Из публикаций последних лет известно, что общая РНК (оРНК), выделенная из клеток костного мозга (ККМ), оказывает индукционное воздействие на процессы восстановительной регенерации органов [1], однако механизмы запуска ее регуляторного эффекта на клеточном уровне остаются не изученными. Между тем выбор стратегии и совершенствование тактики применения клеточных продуктов не может проводиться без учета механизмов, вовлекаемых ими в процесс регенерации.

По утвердившимся представлениям, регенерация органов протекает в рамках активации эволюционно выработанного неспецифического адаптационного синдрома клеточных систем (НАС), который уже на ранних этапах развития стимулирует в клетках комплекс стереотипных приспособительных изменений, направленных на выживание за счет мобилизации собственных сохранившихся резервов и на последующее формирование устойчивой адаптации за счет включения регенерационных механизмов [2, 3]. При моделировании 70% гепатэктомии, ставшей классической моделью для изучения регенерационных процессов в печени, было показано, что от степе-

ни активации в клетках оставшихся частей печени самых ранних проявлений адаптационного синдрома, таких как аутофагия и апоптоз, в значительной степени зависит способность клеточной системы обеспечивать коррекцию своего существования, быть чувствительной к различным корригирующим факторам и запускать эффективный регенераторный процесс [4–7].

Цель настоящей работы: на экспериментальной модели обширной резекции печени крыс изучить динамику формирования в поврежденной печени восстановительных процессов после однократного внутрибрюшинного введения оРНК ККМ, контролируя количественные изменения специфических показателей функции печени и неспецифических субстанционных (микроструктурных) изменений в клетках, являющихся характеристиками фаз развития в них НАС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все исследования с использованием лабораторных животных проводили с соблюдением биоэтических принципов, утвержденных Европейской конвенцией о защите позвоночных животных (2005).

Работа выполнена на 130 крысах-самцах породы Вистар весом 250–300 г, у 80 из которых воспроизвели модель ОРП [8], остальные крысы были использованы для получения несортированных мононуклеарных ККМ и выделения из них оРНК. Перед моделированием ОРП оперируемых крыс наркотизировали ингаляционно диэтиловым эфиром, затем с соблюдением правил асептики и антисептики вскрывали брюшную полость, выводили печень в рану и последовательно накладывали лигатуры на основания срединной, левой боковой и правой верхней долей печени, после чего их удаляли (всего 70–75% общей массы печени). Операцию всегда проводили в утренние часы (в период с 10 до 12 часов), когда суточный ритм митотической активности клеток печени минимален. В раннем послеоперационном периоде у оперированных животных всегда развивалась клиническая картина острой печеночной недостаточности.

Все животные после ОРП были разделены на две группы; группа 1 – контрольная ($n = 40$), в которой крысам однократно внутрибрюшинно вводили по 1,0–1,5 мл физиологического раствора; группа 2 – опытная ($n = 40$), в которой через 3–5 часов после ОРП однократно внутрибрюшинно вводили общую РНК (оРНК), выделенную из несортированной мононуклеарной фракции ККМ здоровых крыс-доноров в дозе 30 мкг/100 г веса, растворенной в 1,0–1,5 мл физиологического раствора.

Общую РНК из мононуклеарной фракции ККМ выделяли с помощью реактива ExtractRNA («Евроген» (Россия) согласно инструкции производителя, которая позволяла получать из каждых $30\text{--}35 \times 10^6$ клеток около $148,5 \pm 22,3$ мкг РНК.

Динамику спонтанного восстановления печеночного гомеостаза в организме после ОРП и влияние оРНК на этот процесс исследовали путем измерения в сыворотке крови в раннем послеоперационном периоде (в течение 14 суток) содержания общего белка и общего билирубина, а также активности печеночных ферментов цитолиза: аланиновой аминотрансферазы (АлАТ), аспарагиновой аминотрансферазы (АсАТ) и щелочной фосфатазы (ЩФ) – стандартными методами на биохимическом анализаторе «Arik-test», Германия. Также исследовали темп преодоления критической массы остатка печени и восстановления его до исходных значений после ОРП в течение 28 суток. Для этого у каждого оперированного животного сразу после ОРП взвешивали резецированную часть печени, которую принимали за 70% от общей массы печени, затем на основании этих измерений рассчитывали исходную массу печени для каждого животного. Далее на каждом исследуемом сроке эксплантировали оставшуюся печень, путем взвешивания определяли ее массу и полученные значения

сравнивали с рассчитанной исходной массой печени для данного животного.

О характере индукционного воздействия на восстановительные процессы в печени критической травмы при создании модели ОРП (группа 1) и о результатах применения оРНК на фоне ОРП (группа 2) судили путем количественной оценки изменения показателей микроструктурного состояния клеток печени. Для этого прежде всего исследовали митотическую активность гепатоцитов в остатке печени через 24, 36, 48 и 72 часа, а также на 5, 7 и 10-е сутки после ОРП в группах 1 и 2. В указанные сроки иссекали печень и готовили из нее гистологические препараты; проводили окраску тканевых срезов гематоксилином и эозином и определяли в 30 полях зрения количество митотически делящихся гепатоцитов в промилле (‰), а также рассчитывали митотический индекс (МИ).

Морфометрическую оценку состояния гепатоцитов также проводили на срезах печени, окрашенных гематоксилином и эозином. При помощи микроскопа Nikon Eclipse 50i, оснащенного цифровой камерой (Япония), были получены микрофотографии срезов печени при увеличении $\times 400$, на которых при помощи пакета программ ImageJ проводили измерение площадей гепатоцитов и их ядер с последующим расчетом площадей цитоплазмы, а также подсчет числа одно- и двухъядерных гепатоцитов с последующим расчетом их процентного соотношения и количества клеток на единицу площади среза.

Поскольку известно, что ОРП относится к критической травме и ранний этап регенерационного процесса всегда сопровождается появлением признаков клеточной аутофагии [4, 5] и обратимой клеточной смерти – обратимого апоптоза [6], срезы печени толщиной 3 мкм окрашивали кроличьими антителами к белку протеолитической системы клеток – Caspase 9 (Abcam) в разведении 1:100 в PBS с добавлением 0,1% Tween 20 и 5% BSA для иммуногистохимического выявления признаков обратимого апоптоза гепатоцитов в раннюю фазу регенерационного процесса через 48 часов. Образцы отмывали и наносили вторичные антитела против IgG кролика, конъюгированные с HRP (Agilent Dako) в растворе PBS-T с 5% BSA. Затем проводили окраску с DAB (Abcam); ядра прокрашивали гематоксилином Майера (Био-Витрум). Микроскопию образцов проводили на оптическом микроскопе Nikon Eclipse TE2000.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли в программной среде вычислений R, характер распределения признаков определяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Достоверность различий изучаемых показателей в двух сравниваемых группах оценивали по t-критериям Уилкоксона и Стьюдента, с учетом поправки Холма–Бонферрони.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Из 80 крыс, у которых моделировали ОРП с развитием острой печеночной недостаточности, погибло 6 животных в течение первых 5 суток после резекции печени, и общая летальность составила 7,5%. Все животные, погибшие после ОРП, относились к контрольной группе 1 (без специальной терапии, n = 40), и внутри этой группы летальность составила 15%. В опытной группе 2 (n = 40) летальность отсутствовала в течение всего срока наблюдения.

Отсутствие летальности в опытной группе 2 сопровождалось ускоренным темпом восстановления печеночного гомеостаза в организме, что выражалось в более ранней нормализации биохимических показателей функции печени: уровня общего белка,

общего билирубина и активности цитолитических ферментов в сыворотке крови.

В табл. 1 и 2 представлены результаты динамического изучения активностей АсАТ, АлАТ, ЩФ, уровня общего билирубина и общего белка в сыворотке крови крыс после моделирования ОРП в контрольной группе (табл. 1) и опытной группе с введением оРНК (табл. 2). В контрольной группе показатели цитолиза у выживших животных были резко повышены в течение первых 5 суток после ОРП, затем стабилизировались, и только начиная с 7–10-х суток появилась отчетливая тенденция к их нормализации. Показатели общего белка в течение 2-х и 3-х суток были резко снижены по сравнению с исходным уровнем, и начиная с 5–7-х суток уровень белка в сыворотке крови постепенно увеличивался, но не

Таблица 1

Динамика изменения уровня общего белка, общего билирубина и активности ферментов цитолиза (АлАТ, АсАТ и ЩФ) в сыворотке крови после ОРП и введения физиологического раствора (ФР) (контрольная группа, n = 40)

Dynamics of changes in the levels of total protein, total bilirubin, and the activity of cytolysis enzymes (AlAT, AsAT, and ALP) in blood serum after ELR and infusion of physiological saline (PS) (control group, n = 40)

Сроки наблюдения (сутки)	Группа 1 (контроль, ФР), n = 40				
	АсАТ, Ед/Л	АлАТ, Ед/Л	ЩФ, Ед/Л	Билирубин общий, мкМ/л	Белок общий, г/л
Исходные значения	58 ± 8,0	40 ± 6,0	240 ± 24	2,2 ± 0,7	98 ± 20
2	570 ± 29*	310 ± 10*	1102 ± 21*	10,2 ± 2,0*	21 ± 16*
3	490 ± 20*	320 ± 21*	1009 ± 29*	12,3 ± 1,5*	24 ± 11*
5	420 ± 27*	290 ± 18*	982 ± 22*	10,8 ± 1,3*	36 ± 13*
7	360 ± 24*	282 ± 15*	893 ± 24*	9,0 ± 1,9*	41 ± 9,0*
10	199 ± 22*	169 ± 18*	560 ± 24*	7,3 ± 2,0*	55 ± 6,0*
14	100 ± 14*	121 ± 13*	340 ± 20*	3,5 ± 1,0	61 ± 7,0

Примечание. * – p < 0,05 по сравнению с исходным уровнем.

Note. * – p < 0,05 compared to baseline.

Таблица 2

Динамика изменения содержания общего белка, общего билирубина и активности ферментов цитолиза (АлАТ, АсАТ и ЩФ) в сыворотке крови после ОРП и введения оРНК в дозе 30 мкг/100 г веса животного (n = 40)

Dynamics of changes in the content of total protein, total bilirubin and the activity of cytolysis enzymes (AlAT, AsAT, and ALP) in the blood serum after ELR and infusion of tRNA at a dose of 30 µg/100 g of animal weight (n = 40)

Сроки наблюдения (сутки)	Группа 2 (опытная, оРНК), n = 40				
	АсАТ, Ед/Л	АлАТ, Ед/Л	ЩФ, Ед/Л	Билирубин общий, мкМ/л	Белок общий, г/л
Исходные значения	58 ± 8,0	40 ± 6,0	240 ± 24	2,2 ± 0,7	98 ± 20
2	423 ± 20*	276 ± 17*	987 ± 30*	7,9 ± 1,3*	48 ± 10*
3	383 ± 28*	108 ± 18*	632 ± 28*	6,5 ± 1,2*	52 ± 9,0*
5	238 ± 19*#	78 ± 10*#	460 ± 32*#	5,1 ± 1,1*#	54 ± 6,0*
7	115 ± 11*#	69 ± 6,2*#	346 ± 26*#	3,1 ± 1,0#	60 ± 7,0
10	82 ± 12#	58 ± 12#	257 ± 15#	2,7 ± 0,9	68 ± 8,0
14	66 ± 7#	44 ± 6#	230 ± 14#	1,9 ± 0,8	84 ± 12

Примечание. * – p < 0,05 по сравнению с исходным уровнем; # – p < 0,05 по сравнению с контролем на том же сроке.

Note. * – p < 0,05 compared to baseline; # – p < 0,05 compared to control at the same time.

достигал исходных значений нормы до конца наблюдений (14-е сутки). В опытной группе, где после ОРП вводили оРНК (табл. 2), показатели цитолиза после ОРП оставались стабильно высокими только в течение 1–3 суток, но уже к 5-м суткам наступало отчетливое снижение активности всех исследованных печеночных ферментов в сыворотке крови крыс по сравнению с контролем ($p < 0,05$) на тех же сроках. В результате в опытной группе с введением оРНК значения исследуемых показателей в сыворотке крови приближалась к норме уже на 10-е сутки и не отличались от исходных значений к 14-м суткам наблюдения, тогда как в контрольной группе нормализация всех исследованных показателей не наступала даже к 14-м суткам. Более высокий темп восстановления показателей печеночного гомеостаза в организме сопровождался в опытной группе достоверным повышением активности пролиферативных процессов в резецированной печени после ОРП по сравнению с контролем.

Исследование митотической активности гепатоцитов в резецированной печени позволило установить ее резкую активацию через 48 часов после моделирования ОРП как в 1-й, так и во 2-й группе по сравнению с исходным уровнем: исходный уровень митотической активности, оцениваемый до резекции печени по митотическому индексу (МИ), составил 0,2–0,3‰ (1–2 митоза на 30 полей зрения). Однако через 48 часов после ОРП выраженность активации МИ в исследуемых группах становилась разной: в

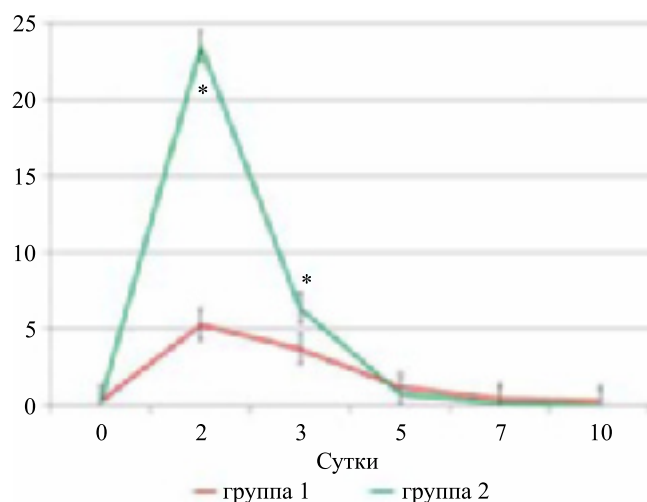


Рис. 1. Динамика изменения митотического индекса гепатоцитов в печени крыс после ОРП в контрольной (группа 1 с введением ФР) и опытной (группа 2 с введением оРНК) группах. * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем на том же сроке

Fig. 1. Dynamics of changes in the mitotic index of hepatocytes in rat livers after ELR in the control (group 1 with the introduction of PS) and experimental (group 2 with the introduction of tRNA) groups. * – $p < 0,05$ compared to control at the same time

1-й, контрольной группе МИ составил 5,378‰ (на 6693 клетки определялось 36 митозов), тогда как во 2-й, опытной группе МИ составил 23,45‰ (на 9678 клеток определялась 227 митозов, т. е. был в 5 раз выше, чем в контрольной группе).

На 3-и сутки после моделирования ОРП МИ в исследуемых группах оставался на более высоком уровне по сравнению с исходным, но изменился по сравнению с 48 часами: в 1-й, контрольной группе МИ снизился и составил 3,7‰, во 2-й, опытной группе МИ также снизился и составил 6,36‰. К 5-м суткам значения МИ в 1-й и 2-й группах приближались к исходному уровню и не различались между собой (рис. 1).

Из полученных результатов сравнительного изучения митотической активности гепатоцитов в двух исследуемых группах следует, что ОРП сама по себе индуцирует пролиферативную активность гепатоцитов, а введение оРНК из ККМ уже на ранних сроках существенно усиливает пролиферативную активность клеток.

Более высокая митотическая активность гепатоцитов в группе 2 (введение оРНК) сопровождалась достоверно более ускоренным темпом восстановления массы печени. На рис. 2 представлена динамика восстановления массы печени после ОРП в контрольной и опытной группах.

Из представленного графика следует, что более высокий темп восстановления массы печени был отмечен в опытной группе, в которой через 3–5 часов после ОРП и внутрибрюшинного введения оРНК восстановление массы печени происходило к 10–12-м суткам.

В контрольной группе с внутрибрюшинным введением физиологического раствора восстановление массы печени происходило только на 18–20-е сутки после ОРП. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что введение оРНК в дозе 30 мкг/100 г веса животного индуцирует более выраженную активацию регенерационных процессов в печени после ОРП. Это можно объяснить тем, что оРНК ККМ представляет собой готовый комплекс сигнальных молекул РНК различных классов, который способен беспрепятственно и быстро проникать в различные клетки, а также адресно транспортироваться ими (и их экзосомами), особенно с помощью мононуклеарных клеток (лимфоцитов) крови [9]. Важно отметить также, что при изучении динамики восстановления массы печени после ОРП в опытах с применением оРНК масса резецированной печени на ранних сроках (ко 2-м суткам) оказывалась достоверно меньше, чем масса печени контрольной группы (рис. 2).

Если учесть известные факты о том, что процесс регенерации печени после ОРП на раннем этапе сопровождается явлениями клеточной аутофагии [4, 5]

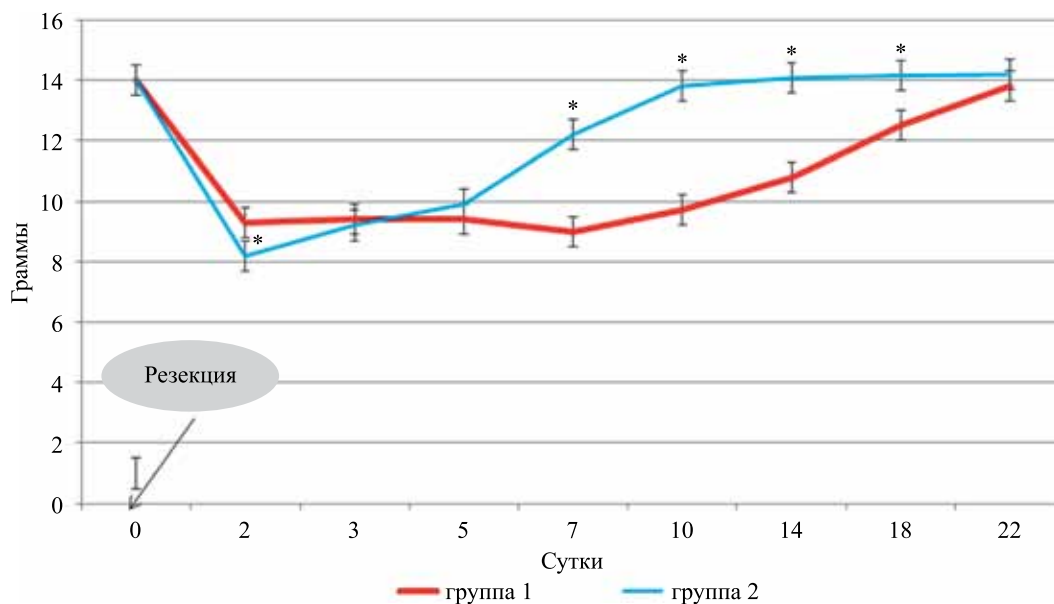


Рис. 2. Динамика восстановления исходной массы печени крыс после ОРП в контрольной (группа 1 с введением ФР) и опытной (группа 2 с введением оРНК) группах. * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем на том же сроке

Fig. 2. Dynamics of the initial mass restoration of rat livers after ELR in the control (group 1 with the introduction of PS) and experimental (group 2 with the introduction of tRNA) groups. * – $p < 0,05$ compared to control at the same time

и усилением признаков обратимого и даже необратимого апоптоза гепатоцитов [6], то полученные результаты позволяют предположить, что оРНК ускоряет процесс восстановительной регенерации печени по сравнению с контролем за счет более резкого и раннего (по-видимому, уже в течение 1-х суток) и более длительного (в течение 2-х суток) усиления проявлений мобилизации и расходования собственных клеточных резервов (усиление аутофагии и апоптоза)

при развитии НАС и восстановительного процесса как результата сочетанного воздействия на клетки печени двух факторов: ОРП и оРНК.

Действительно, сравнительное иммуногистохимическое исследование активности Caspase-9 – показателя обратимого апоптоза в клетках печени контрольной и опытной групп через 48 ч после ОРП, т. е. на высоте активации митотической активности гепатоцитов, показало (рис. 3, а и б), что как в

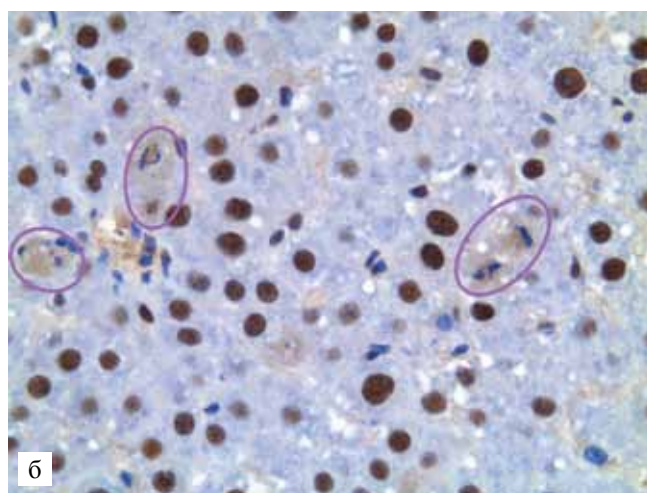
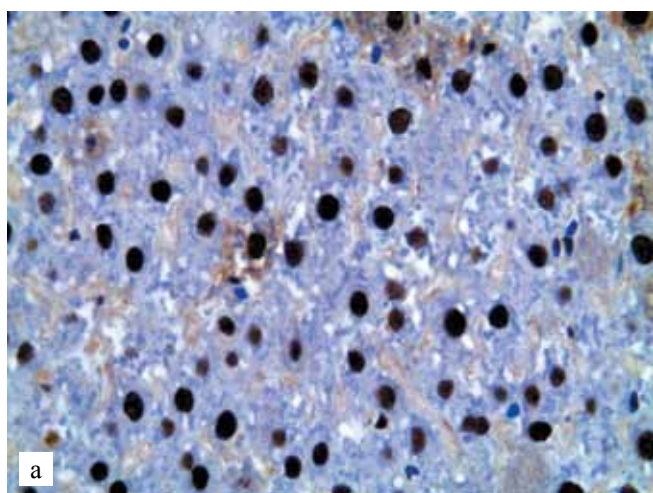


Рис. 3. Иммуногистохимическое исследование активности Caspase-9 в гепатоцитах через 48 ч после ОРП в контрольной группе с введением физиологического раствора (а) и в опытной группе с введением оРНК из ККМ (б). $\times 40$. Клетки в фазе митоза указаны кружками

Fig. 3. Immunohistochemical investigation of Caspase-9 activity in hepatocytes in 48 hours after ELR in the control group with infusion of physiological saline (а) and in the experimental group with infusion of tRNA of BMCs (б). $\times 40$. Cells in the mitosis phase are indicated by circles

контрольной, так и в опытной группе процесс обратимого апоптоза был индуцирован более чем у 90% гепатоцитов. Изучение экспрессии Caspase-9 в клетках печени интактных животных не выявило в них наличия данного маркера. Полученные данные указывают на практически тотальную активацию в клетках печени после ОРП адаптивно-зависимого апоптоза в двух исследуемых группах. Однако в отличие от контрольной группы в опытной группе введение оРНК приводило к отчетливому усилению митотической активности гепатоцитов. Этот эффект наблюдали и для гепатоцитов, которые выходили из состояния обратимого апоптоза, т. к. в митотически делящихся гепатоцитах окрашенный хромоген субстрат вымывался из делящегося ядра и переходил в цитоплазму (рис. 3, б). Полученные результаты свидетельствуют о том, что оРНК, введенная в организм на фоне ОРП, по-видимому, действует в рамках неспецифического адаптационного синдрома клеточных систем как адекватный адаптоген, который включает и оптимизирует резервы выживания клеток, переключая в них эволюционно запрограммированные регуляторные механизмы с апоптоза на пролиферацию клеток. Последнее оказывается возможным, если на ранних сроках после ОРП сигналы апоптоза и пролиферации в клетках печени оказываются в ко-активированном состоянии. По мнению И.М. Газизова и соавторов [6], точкой пересечения этих сигналов могут быть факторы STAT-3 и NFK-β, при значительном увеличении уровней и активностей которых клетки подавляют апоптоз путем экспрессии антиапоптотических белков Bcl-2, Bcl-x1, HSP-70, выходят из G0-фазы и вступают в пролиферацию. Возможность перехода клеток из состояния апоптоза в фазу пролиферации показана также в работе [10].

Известно, что развитие апоптоза характеризуется возникновением определенных изменений в морфологии клеток (ядро и цитоплазма уменьшаются в размерах, конденсируются без нарушения структурной целостности клеточных мембран и развития воспаления). Для доказательства развития адаптивно-зависимого апоптоза клеток печени на ранних сроках после ОРП и активного переключения клеток с проапоптотического пути на путь пролиферации и восстановительной регенерации при использовании оРНК была проведена сравнительная морфометрия гепатоцитов в печени крыс контрольной и опытной групп через 48 часов после ОРП, т. е. на сроке максимальной митотической активности гепатоцитов. Результаты морфометрического исследования гепатоцитов в контрольной и опытной группах – без и с введением оРНК по сравнению с интактными животными (без ОРП) – представлены в табл. 3 и 4. В печени крыс контрольной группы наблюдаются достоверные изменения цитометрических показателей одноядерных и двухъядерных гепатоцитов. Так, пострезекционные изменения через 48 часов характеризовались уменьшением площадей одноядерных гепатоцитов, их ядер и цитоплазмы на 30,2; 34,0; 29,9% соответственно и снижением этих показателей для двухъядерных гепатоцитов на 20,5; 35,0; 23,4% по сравнению с гепатоцитами в печени интактной группы крыс. Также было выявлено статистически значимое уменьшение числа двухъядерных гепатоцитов на 5,27% на фоне роста общего числа клеток на единицу площади на 27,3% (табл. 4).

Для печени опытной группы внутрибрюшинное введение оРНК приводило к изменению всех исследованных цитометрических показателей одноядерных гепатоцитов, и в меньшей степени влияло на

Таблица 3

Изменения цитометрических показателей одноядерных и двухъядерных гепатоцитов через 48 часов после ОРП без и с введением оРНК из ККМ (Me(Q₁; Q₂)) (медиана (25-й; 75-й перцентили)

Changes in the cytometric indices of single- and double-nuclear hepatocytes in 48 hours after ELR without and with infusion of tRNA of BMCs (Me (Q₁; Q₂)) (median (25th, 75th percentiles))

Показатель	Группа	Интактные	Контрольная группа, ФР	Опытная группа, оРНК
Показатели одноядерных гепатоцитов				
Пл. клетки, мкм ²		318,7 (268,5; 378,4)	222,4 (174,1; 281,2) ¹	272,7 (219,4; 336,2)*
Пл. ядра, мкм ²		55,8 (50,0; 75,7)	36,8 (30,4; 41,9) ¹	45,6 (38,2; 52,2)*
Пл. цитоплазмы, мкм ²		262,6 (213,5; 309,4)	184,1 (141,6; 239,5) ¹	228,9 (179,7; 287,8)*
Показатели двухъядерных гепатоцитов				
Пл. клетки, мкм ²		420,1 (376,0; 489,2)	333,9 (279,0; 376,2) ¹	355,6 (293,0; 439,5)
Пл. ядра, мкм ²		100,1 (90,6; 108,9)	65,0 (53,5; 74,9) ¹	75,4 (60,2; 90,0)*
Пл. цитоплазмы, мкм ²		321,0 (286,0; 382,1)	261,1 (226,6; 307,5) ¹	276,8 (231,2; 341,8)

Примечание. ¹ – различия достоверны (p ≤ 0,01) по сравнению с интактной группой; * – различия достоверны (p ≤ 0,01) по сравнению с контрольной группой крыс, подвергавшихся ОРП; Пл. – средняя площадь.

Note. ¹ – the differences are significant (p ≤ 0,01) compared with the intact group; * – the differences are significant (p ≤ 0,01) compared to the control group of rats with ELR; Пл. – average area.

Таблица 4

Изменение общего числа гепатоцитов на единицу площади и доли одно- и двухъядерных клеток через 48 часов после ОРП без и с введением оРНК ($M \pm m$)**Change in the total number of hepatocytes per unit area and the percent of single- and double-nuclear cells in 48 hours after ELR without and with infusion of tRNA ($M \pm m$)**

Показатель	Группа	Интактные	Контрольная группа, ФР	Опытная группа, оРНК
Общее число клеток на 50 000 мкм ²		78,4 ± 4,9	100,8 ± 9,2 ¹	95,2 ± 5,7
Доля одноядерных клеток, %		87,43 ± 0,95	92,70 ± 0,75 ¹	91,81 ± 0,40
Доля двухъядерных клеток, %		12,57 ± 0,95	7,30 ± 0,75 ¹	8,19 ± 0,40

Примечание. ¹ – различия достоверны ($p \leq 0,01$) по сравнению с интактной группой.

Note. ¹ – differences are significant ($p \leq 0,01$) compared with an intact group.

показатели двухъядерных гепатоцитов. Так, при введении оРНК наблюдался рост площадей одноядерных гепатоцитов, их ядер и цитоплазмы на 22,6; 23,9 и 24,3% соответственно по сравнению с контрольной группой. При этом не было обнаружено изменений в количестве двухъядерных клеток (табл. 4), но наблюдали увеличение площади ядер двухъядерных гепатоцитов на 15,5% по сравнению с контрольной группой (табл. 3).

Результаты морфоцитометрии гепатоцитов через 48 часов после ОРП в контрольной группе позволяют предположить, что в условиях практически тотальной активации Caspase-9 (более чем 90% гепатоцитов) и не резко выраженного увеличения пролиферативной активности гепатоцитов (митотический индекс – 5,37%) увеличение клеточной плотности, а также общее уменьшение площадей гепатоцитов, их ядер, цитоплазмы свидетельствует прежде всего о преимущественном усилении в клетках печени процессов аутофагии и обратимого апоптоза на ранних сроках после ОРП. Наблюдаемое снижение количества двухъядерных клеток в печени контрольной группы крыс может быть связано с их делением и образованием одноядерных клеток [11].

Введение оРНК ККМ на сроке 48 часов после ОРП сохраняет неизменным высокий уровень активности Caspase-9 в гепатоцитах. Наблюдается более резкое снижение массы резецированной печени на этом сроке по сравнению с контрольной группой в результате стрессорного воздействия ОРП и оРНК. При этом в печени резко возрастает митотическая активность гепатоцитов (МИ = 23,45%) и начинается достоверное восстановление морфометрических показателей (увеличение площадей ядер, клеток, и цитоплазмы по сравнению с контрольной группой) преимущественно одноядерных гепатоцитов, которые, по-видимому, способны более активно, чем двухъядерные гепатоциты, пролиферировать и гипертрофироваться в критических ситуациях. В то же время сохраняющаяся более высокая плотность клеток на единицу площади на фоне применения оРНК

также свидетельствует о продолжающемся апоптозе клеток на исследуемом сроке.

Доказанное на экспериментальной модели ОРП свойство оРНК одновременно поддерживать в клетках печени процессы апоптоза и индуцировать в них митотическую активность свидетельствует о том, что оРНК способна переключать на ранней фазе регенерационного процесса активировавшийся апоптоз на пролиферацию клеток. Обнаруженный эффект с большой вероятностью обусловлен наличием регуляторных молекул РНК, в том числе многочисленных белок-некодирующих РНК [12–14], активно участвующих в регенерационных процессах и входящих в состав оРНК ККМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты позволяют прийти к заключению, что оРНК, используемая для индукции восстановительных процессов в печени, способствует на клеточном уровне активации ранних проявлений эволюционно выработанного неспецифического адаптационного механизма выживания клеток, одновременно поддерживая в них сигнальные пути, и апоптоза, и пролиферации в ко-активированном состоянии, а также индуцирует переход клеток от адаптивно-зависимого апоптоза к пролиферации путем экспрессии анти-апоптотических белков, гены которых являются мишенями многочисленных регуляторных молекул РНК, входящих в состав оРНК ККМ.

Авторы статьи выражают глубокую благодарность к. м. н. Люндуну Алексею Валерьевичу за содействие в организации иммуногистохимических исследований печени и участие в обсуждении полученных материалов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Бабаева АГ, Тишевская НВ, Геворкян НМ. О морфогенетических свойствах РНК лимфоидных и стволовых клеток при восстановительных процессах. Российская академия наук. *Научно-исследовательский институт морфологии человека*. – М., 2016. 272. *Babaeva AG, Tishevskaya NV, Gevorkyan NM*. About morphogenetic properties of RNA of lymphoid and stem cells at regenerative processes. RAN. *Research Institute of human morphology*. М., 2016. 272.
2. Браун АД, Мозженок ГП. Неспецифический адаптационный синдром клеточной системы. Л.: Наука, 1987. 232. *Braun AD, Mozhenok GP*. Nonspecific adaptive syndrome of cellular system. L.: Nauka, 1987. 232. (In Russ.).
3. Онищенко НА. Цитогенетическая рекапитуляция, индуцированная медикаментозными препаратами, как универсальный этап формирования срочной защиты органов от повреждения при трансплантации. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2016; 60 (4): 148–153. *Onishchenko NA*. Cytogenetic recapitulation, induced by medical preparations, as the universal stage of formation of urgent protection against damage at organ transplantation. *Pathological Physiology and Experimental Therapy*. (Russian Journal). 2016; 60 (4): 148–153. (In Russ.).
4. Lin CW, Chen YS, Lin CC, Chen YJ, Lee PH, Kuo PL et al. Amiodarone as an autophagy promoter reduces liver injury and enhances liver regeneration and survival in mice after partial hepatectomy. *Sci Rep*. 2015 Oct 30; 5: 15807. doi: 10.1038/srep15807.
5. Cheng Y, Wang B, Zhou H, Dang S, Jin M, Shi Y et al. Autophagy is required for maintenance of liver progenitor cell functionality. *Cell Physiol Biochem*. 2015; 36 (3): 1163–1174.
6. Газизов ИМ, Гумерова АА, Киясов АП. Апоптоз в регенерационном гистогенезе печени после частичной гепатэктомии у крыс. *Гены и клетки*. 2015; 10 (3): 22–26. *Gazizov IM, Gumerova AA, Kiyasov AP*. Apoptosis in regenerative histogenesis of the liver after partial hepatectomy in rats. *Genes and cells*. 2015; 10 (3): 22–26.
7. Монголов ХП, Плеханов АН. Взаимосвязь апоптоза и регенерации печени при печеночной недостаточности после частичной гепатэктомии в эксперименте. *Acta Biomedica Scientifica*. 2009; 3: 203–206. *Mongolov KhP, Plekhanov AN*. Interrelation of apoptosis and liver regeneration in hepatic insufficiency after partial hepatectomy in an experiment. *Acta Biomedica Scientifica*. 2009; 3: 203–206.
8. Патент на изобретение 2701792 РФ, МПК А61К35/28 (2019.08) «Способ лечения острой печеночной недостаточности» / Н.А. Онищенко, З.З. Гоникова, А.О. Никольская, Л.А. Кирсанова, М.Ю. Шагидулин, В.И. Севастьянов, С.В. Готье. – 2018138281; заявл. 30.10.2018; опубл. 01.10.2019, Бюл. 28. Patent na izobrenenie 2701792 RF, MPK A61K35/28 (2019.08) «Sposob lecheniya ostroy pechenochnoy nedostatochnosti» / N.A. Onishchenko, Z.Z. Gonikova, A.O. Nikol'skaya, L.A. Kirsanova, M.Yu. Shagidulin, V.I. Sevastyanov, S.V. Gautier. – 2018138281; zayavl. 30.10.2018; opubl. 01.10.2019, Byul. 28.
9. Тишевская НВ, Бабаева АГ, Геворкян НМ. Роль лимфоцитарных РНК в межклеточном информационном обмене и регуляции регенеративных процессов. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2016; 102 (11): 1280–1301. *Tishevskaya NV, Babayeva AG, Gevorkyan NM*. Role of lymphocytic RNAs in intercellular information exchange and regulation of regenerative processes. *I.M. Sechenov Russian journal of physiology*. 2016; 102 (11): 1280–1301.
10. Budd RC. Death receptors couple to both cell proliferations and apoptosis. *J Clin Invest*. 2002 Feb 15; 109 (4): 437–442.
11. Miyaoka Y, Ebato K, Kato H, Arakawa S, Shimizu S, Miyajima A. Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration. *Curr Bio*. 2012; 22 (13): 1166–1175.
12. Yan IK, Wang X, Asmann YW, Haga H, Patel T. Circulating Extracellular RNA Markers of Liver Regeneration. *PLoS One*. 2016; 11 (7). doi: 10.1371/journal.pone.0155888.
13. Li J, Jin W, Qin Y, Zhao W, Chang C, Xu C. Expression Profile and Function Analysis of LncRNAs during Priming Phase of Rat Liver Regeneration. *PLoS One*. 2016 Jun 21; 11 (6). doi: 10.1371/journal.pone.0156128.
14. Mottaghitlab F, Rastegari A, Farokhi M, Dinarvand R, Hosseinkhani H et al. Prospects of siRNA applications in regenerative medicine. *International Journal of Pharmaceutics*. 2017 May 30; 524 (1–2): 312–329.

Статья поступила в редакцию 30.06.2020 г.
The article was submitted to the journal on 30.06.2020