

Оригинальная статья

@ Маклакова И.Ю., Гребнев Д.Ю., Осипенко А.В., 2021

УДК: 616.36-089.843-092.9:612.359

DOI: 10.52420/2071-5943-2021-20-1-16-22

ВЛИЯНИЕ СОЧЕТАННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК И ЗВЕЗДЧАТЫХ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ НА ЕЕ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПОСЛЕ ЧАСТИЧНОЙ ГЕПАТЭКТОМИИ

И.Ю. Маклакова^{1,2}, Д.Ю. Гребнев^{1,2}, А.В. Осипенко¹¹ ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Екатеринбург, Российская Федерация² ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», г. Екатеринбург, Российская Федерация

Целью исследования было изучение изменения морфофункционального состояния печени после проведения сочетанной трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных (ММСК) и звездчатых клеток печени (ЗКП) животным с частичной гепатэктомией. **Материалы и методы.** Выделение культуры ММСК осуществляли из хориона плаценты 5 лабораторных животных мышей-самок возраста 3–4 месяцев, массой 22–23 г, срок гестации составлял 18 дней. Мононуклеарную фракцию клеток получали путем последовательной механической и ферментативной обработки ткани плаценты. Культивирование ММСК проводили в условиях CO₂-инкубатора при температуре 37 °С с содержанием углекислого газа 5% и влажностью 90%. Выделение ЗКП осуществляли методом коллагеназно-прозрачной перфузии печени с последующим разделением клеток в градиенте плотности гистоденза. Осуществляли введение ММСК после третьего пассажа, ЗКП вводили в хвостовую вену непосредственно после выделения. Для трансплантации лабораторным животным использовали ММСК в дозе 4 млн клеток/кг и ЗКП в дозе 9 млн клеток/кг. Введение клеток в хвостовую вену проводили через 1 час после частичной гепатэктомии. Производили оценку биохимических показателей периферической крови и морфометрических показателей печени на 3, 7 сутки после проведения частичной гепатэктомии. **Результаты.** Сочетанная трансплантация ММСК и ЗКП после частичной гепатэктомии приводит к восстановлению уровня ферментов, характеризующих цитолиз и холестаза, нормализации белковосинтетической функции печени, нормализации морфометрических показателей печени. Значимым механизмом восстановления морфофункционального состояния печени можно считать влияние трансплантируемых ММСК и ЗКП на систему репарации клеток, что приводит к снижению выраженности запрограммированной клеточной гибели гепатоцитов и уровня патологических митозов. **Обсуждение.** Сочетанная трансплантация ММСК и ЗКП после частичной гепатэктомии приводит к повышению уровня фактора роста гепатоцитов (HGF), способствуя, таким образом, повышению митотической активности гепатоцитов и восстановлению массы печени. Трансплантируемые клетки также, повышая активность ферментов репарации ДНК семейства PARP, приводят к снижению уровня патологических митозов, угнетению их запрограммированной клеточной гибели. **Выводы.** Проведенные исследования свидетельствуют о способности сочетанной трансплантации ММСК и ЗКП обеспечивать восстановление морфофункционального состояния печени после частичной гепатэктомии и дают основание для проведения пилотных клинических исследований.

Ключевые слова: частичная гепатэктомия, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, звездчатые клетки печени, морфофункциональное состояние печени.

Цитирование: Маклакова, И. Ю. Влияние сочетанной трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и звездчатых клеток печени на ее морфофункциональное состояние после частичной гепатэктомии / И. Ю. Маклакова, Д. Ю. Гребнев, А. В. Осипенко // Уральский медицинский журнал. – 2021. – Т. 20, № 1. – С. 16–22. – Doi: 10.52420/2071-5943-2021-20-1-16-22.

Cite as: Maklakova, I. Yu. Influence of combined transplantation of multipotent mesenchymal stromal cells and stellate liver cells on its morphofunctional state after partial hepatectomy / I. Yu. Maklakova, D. Yu. Grebnev, A. V. Osipenko // Ural medical journal. – 2021. – Vol. 20, № 1. – P. 16–22. – Doi: 10.52420/2071-5943-2021-20-1-XX-XX.

Рукопись поступила: 19.03.2021. Принята в печать: 29.03.2021

Рукопись поступила: 19.03.2021. Принята в печать: 29.03.2021

INFLUENCE OF COMBINED TRANSPLANTATION OF MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELLS AND STELLATE LIVER CELLS ON ITS MORPHOFUNCTIONAL STATE AFTER PARTIAL HEPATECTOMY

I. Yu. Maklakova^{1,2}, D. Yu. Grebnev^{1,2}, A.V. Osipenko¹

¹ Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

² Institute of medical cell technologies, Ekaterinburg, Russian Federation

The aim of the study was to study the changes in the morphofunctional state of the liver after the combined transplantation of multipotent mesenchymal stromal (MMSC) and stellate liver cells (ZCP) in animals with partial hepatectomy. **Materials and methods.** The MMSC culture was isolated from the placental chorion of 5 laboratory animals of female mice aged 3-4 months, weighing 22-23 g, gestation period of 18 days. The mononuclear fraction of the cells was obtained by sequential mechanical and enzymatic treatment of the placental tissue. The cultivation of MMSCs was carried out in a CO₂ incubator at a temperature of 37 °C with a carbon dioxide content of 5% and a humidity of 90%. ZCP was isolated by collagenase-pronase perfusion of the liver, followed by cell separation in the histodense density gradient. MMSCs of the 3rd passage were introduced, and ZCP was introduced immediately after isolation. MMSCs at a dose of 4 million cells/kg and ZCP at a dose of 9 million cells/kg were used for transplantation to laboratory animals. The cells were injected 1 hour after partial hepatectomy. The biochemical parameters of peripheral blood and morphometric parameters of the liver were evaluated on the 3rd, 7th day after the administration of MMSC. **Results.** As a result of the study, it was found that the combined transplantation of MMSC and ZCP after partial hepatectomy leads to the restoration of the level of enzymes that characterize cytolysis and cholestasis, normalization of the protein-synthetic function of the liver, normalization of the morphometric parameters of the liver. A significant mechanism for restoring the morphofunctional state of the liver can be considered the influence of transplanted MMSCs and ZCP on the cell repair system, which leads to a decrease in the severity of programmed cell death of hepatocytes and the level of pathological mitoses. **Discussion.** Combined transplantation of MMSCs and HCP after partial hepatectomy leads to an increase in the level of hepatocyte growth factor (HGF), thus contributing to an increase in the mitotic activity of hepatocytes and the restoration of liver mass. The transplanted cells also, by increasing the activity of DNA repair enzymes of the PARP family, lead to a decrease in the level of pathological mitoses, inhibition of their programmed cell death. **Conclusions.** The conducted studies demonstrate the ability of combined MMSC and PCR transplantation to restore the morphofunctional state of the liver after partial hepatectomy and provide the basis for conducting pilot clinical studies

Keywords: partial hepatectomy, multipotent mesenchymal stromal cells, stellate liver cells, morphofunctional state of the liver.

ВВЕДЕНИЕ

Проблема восстановления поврежденных тканей и органов является актуальной задачей современной регенеративной медицины [1, 2]. Это непосредственно касается такого жизненно важного органа, как печень, патология которого находится в десятке основных причин смертности населения [3, 4]. Благодаря совершенствованию оперативных методов лечения и способности печени восстанавливать свою массу, обширные резекции печени регулярно выполняются при злокачественных и доброкачественных заболеваниях печени. Вместе с тем остается актуальной проблема развития печеночной недостаточности после частичной гепатэктомии [5, 6, 7]. Так, к факторам ее развития относят: дефицит массы оставшейся части печени, пожилой возраст пациента и наличие ранее существовавших заболеваний печени, таких как цирроз, хронический гепатит и жировая болезнь печени. Каждое из этих состояний нарушает нормальные регенеративные пути и/или инициирует апоптоз, что приводит к нарушению функций гепатоцитов после частичной гепатэктомии. Предпринимаемые усилия по разработке и внедрению новых методов по активации регенерации печени не всегда являются эффективными [8, 9, 10].

Перспективным направлением активации механизмов регенерации печени после ее повреждения представляется применение клеточных техно-

логий. На наш взгляд, наиболее актуальным может являться использование мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) и звездчатых клеток печени (ЗКП) (клетки Ито, перисинусоидальные клетки), поскольку они обладают рядом уникальных биологических свойств. Так, ММСК реализуют свое действие через различные механизмы: паракринный, путем формирования межклеточных контактов, способны к трансдифференцировке в гепатоциты и стимуляции регенерации печени за счет слияния с гепатоцитами (fusion-effect) [11, 12, 13]. ММСК можно сравнить с фабрикой по производству биологически активных веществ. Они вырабатывают цитокины, обладающие противовоспалительным действием (ИЛ4, ИЛ10, TGF- β), факторы роста (SCF, EGF, FGF, VEGF) [14, 15, 16, 17].

Звездчатые клетки печени рассматриваются в качестве претендентов на роль стволовой клетки печени. Пролиферативную активность звездчатых клеток и их дифференцировку в гепатоциты и холангиоциты способны повышать факторы роста, вырабатываемые ММСК [18, 19, 20]. Звездчатые клетки печени, в свою очередь, вырабатывают хемоаттрактант для ММСК (SDF-1), обеспечивая их направленную миграцию [21, 22, 23]. Учитывая биологические взаимодействия между ММСК и ЗКП, представляется перспективным использование их сочетанной трансплантации для активации регенерации печени после частичной гепатэктомии.

Цель исследования — изучить механизмы действия сочетанной трансплантации ММСК и ЗКП на морфофункциональное состояние печени после частичной гепатэктомии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на 42 белых беспородных мышах-самцах возраста 7-8 месяцев, массой 25-27 г. Опыты, уход и содержание животных осуществлялись в соответствии с Директивой № 63 от 22 сентября 2010 года Президиума и Парламента Европы «О защите животных, используемых для научных исследований» и приказом Минздрава РФ № 267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики». Проведение исследований одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, протокол № 8 от 20.10.2017 г.

Источником ММСК являлся хорион плаценты 5 лабораторных животных мышей-самок возраста 3-4 месяцев, срок гестации составлял 18 дней. Мембранную фракцию клеток получали путем последовательной механической и ферментативной (раствор аккутазы (Millipore, США)) обработки ткани плаценты. Выделение ЗКП осуществляли методом коллагеназно-проназной перфузии печени с последующим разделением клеток в градиенте плотности гистоденза. Культивирование ММСК проводили в условиях CO₂-инкубатора (TermoScientific, США) при температуре 37 °C с содержанием углекислого газа 5% и влажностью 90%. Для трансплантации лабораторным животным использовали ММСК третьего пассажа. Введение ЗКП проводили непосредственно после выделения клеток.

Имунофенотипирование суспензии ММСК проводили методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител, конъюгированных с флуорохромами (Becton Dickinson, США). Во фракции трансплантируемых клеток оценивали содержание ММСК с иммунофенотипом положительных по CD105 (Rat IgG2A Anti-Mouse Endoglin/CD105-Fluorescein Clone 209701, RTU), CD29 (Rat IgG2A Anti-Mouse Integrin beta 1/CD29-PE Clone 265917), Sca-1 (Rat IgG2A Anti-Mouse Sca-1-APC Clone 177228) и отрицательных по CD45 (Rat IgG2B Anti-Mouse CD45-PerCP Clone 30-F11) (Becton Dickinson, США) на проточном цитометре Beckman Coulter Navios с помощью набора Mouse Mesenchymal Stem Cell Multi-Color Flow Cytometry Kit (Bio-Techne, США). Количество жизнеспособных клеток с фенотипом CD45-CD105+Sca1+CD29+ составило 93%. Функциональные свойства ММСК оценивали по их дифференцировке в адипоцитарном и остеогенном направлениях. Состав среды, индуцирующей дифференцировку в остеогенном направлении: Mesen Cult™ Osteogenic Stimulatory Supplement (Stem Cell Technologies, Канада) и в адипоцитарном направлении: Mesen Cult™ Adipogenic Stimulatory Supplement («Stem Cell Technologies», Канада) и Mesen Cult™ MSC Basal Medium (Mouse) («Stem Cell Technologies», Канада) в соотношении 1:4, 2 ммоль раствора L-глутамин («Stem Cell Technologies», Канада). Наличие остеогенной дифференцировки подтверждали гистохимическим методом по увеличению экспрессии щелочной фосфатазы, а также окраской поvon Kossa, выявляющей наличие минерализованного фосфата кальция. Дифференциацию в адипоцитарном направлении подтверждали гистохимическим методом

окраской липидных вакуолей красителем Oil Red O.

Идентификацию ЗКП проводили на проточном цитометре по оценке эндогенной ретиноидной флуоресценции. Жизнеспособность клеток перед трансплантацией определяли красителем 7-AAD (7-Aminoactinomycin D), она составила 95-97%.

Мышей разделили на три группы: опытная, контрольная, группа сравнения (по 7 животных в каждой). Опытной и контрольной группам проводили частичную гепатэктомию по методу C. Mitchell и H. Willenbring [24]. Для анестезии использовали «Золетил» в дозе 10 мг/кг (Virbac, Франция).

Мышам опытной группы ММСК и ЗКП вводили в латеральную хвостовую вену соответственно в дозе 4 млн клеток/кг (120 тыс. клеток/мышь) и 9 млн клеток/кг (270 тыс. клеток/мышь), суспензированных в 0,2 мл 0,9% раствора NaCl. Животным контрольной группы вводили 0,9% раствор NaCl — 0,2 мл в латеральную хвостовую вену. Группу сравнения составили лабораторные мыши без частичной гепатэктомии, которым вводили 0,9% раствор NaCl 0,2 мл.

На 3 и 7 сутки после введения клеток исследовали морфометрию печени и биохимические показатели сыворотки крови. Для оценки морфометрических показателей печени изготавливали гистологические срезы толщиной 3-5 мкм, окрашивали гематоксилином-эозином. Для морфометрического анализа данных использовали компьютерную программу анализа изображений (Biovision, Россия). Анализировали следующие показатели: количество гепатоцитов на 1 мм², площадь гепатоцитов, площадь ядра гепатоцита, площадь цитоплазмы гепатоцита, ядерно-цитоплазматический индекс, количество двуядерных гепатоцитов на 1 мм², митотический индекс. Для оценки апоптоза использовали набор первичных (Caspase-3 Antibody (L-18) goatpolyclonalIgG, 1:100) (SantaCruz Biotech, USA) и вторичных антител (donkeyanti-goatIgG-FITC, 1:100) (Santa Cruz Biotech, USA) на гистологических срезах по идентификации эффекторной каспазы-3. Величину запрограммированной гибели гепатоцитов определяли расчетом апоптотического индекса:

Апоптотический индекс

$$= \frac{\text{(Количество гепатоцитов в состоянии апоптоза)}}{\text{(1000 подсчитанных гепатоцитов)}} \times 1000\%$$

Микроядерный тест определяли после механической и ферментативной обработки (проназа E, коллагеназа I тип и ДНК-аза (Sigma)) клеток печени и окраски 2,5% ацетоорсеином с докрасиванием цитоплазмы клеток 1% спиртовым раствором светлого зеленого [25].

Для оценки выраженности репаративных процессов в клетках печени анализировали количество Поли-АДФ-рибозополимера, являющегося продуктом реакции Поли-АДФ-рибозилирования, определяя первичные (Anti-Poly (ADP-Ribose) Polymerantibody, abcam) и вторичные антитела (Rabbit Anti-Chicken IgY H&L (FITC)) на проточном цитометре. Рассчитывали среднюю интенсивность флуоресценции популяции клеток (MFI), характеризующую экспрессию антигенов (плотность рецепторов) внутри клетки [26].

Биохимические показатели сыворотки крови — альбумин, аспартатаминотрансфераза (АСТ), аланинаминотрансфераза (АЛТ), щелочная фосфатаза (ЩФ) — определяли кинетическими методами с использованием анализатора Chem Well 2910 (Combi) и реагентов «Ольвекс Диагностикум», Россия.

С помощью набора HGF Mouse ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (Abcam) методом иммуноферментного анализа осуществлялось количественное измерение HGF в сыворотке крови.

Исходные данные имели нормальное распределение. Для проверки нормальности распределения был использован критерий Шапиро-Уилка. Достоверность отличий в сравниваемых выборках определялась с применением t-критерия Стьюдента. Данные представлены в виде среднего арифметического значения (M) и стандартным отклонением (SD). Статистическая обработка данных проведена с помощью программного пакета SPSSStatistics (версия 17,0).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При оценке морфометрических показателей печени на 3 сутки после частичной гепатэктомии у животных после введения ММСК и ЗКП обнаружено увеличение массы печени на 20,2% ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой. Восстановление ее массы сопровождалось повышением митотической активности гепатоцитов на 23,8% ($p < 0,05$), снижением запрограммированной клеточной гибели на 27,7% ($p < 0,05$), а также повышением количества двуядерных гепатоцитов на 26,8% ($p < 0,05$) увеличению площади ядра гепатоцитова на 25,5% ($p < 0,05$) и увеличению ЯЦИ на 24,9% ($p < 0,05$) (табл. 1).

Таблица 1

Морфометрическая характеристика репаративных процессов в печени мышей на 3 сутки после частичной гепатэктомии

Показатели	Значение		
	NaCl (группа сравнения)	NaCl (контрольная группа)	ММСК+ЗКП (опытная группа)
Масса печени, г	1,81±0,15	1,04±0,09*	1,25±0,10**
Апоптотический индекс, ‰	0,43±0,04	2,13±0,20*	1,54±0,15**
Количество гепатоцитов с микроядрами, ‰	2,21±0,18	3,37±0,26*	2,97±0,20*
Митотический индекс, ‰	0,74±0,06	8,1±0,60*	10,03±0,75**
Количество гепатоцитова на 1 мкм ²	1525,57±101,06	1206,72±91,96*	1160,0±113,14*
Площадь гепатоцита (мкм ²)	267,53±6,39	331,81±24,02 *	333,43±18,20*
Площадь цитоплазмы гепатоцита (мкм ²)	219,14±7,12	243,64±19,25	249,14±9,84
Площадь ядра гепатоцита (мкм ²)	48,40±3,57	67,13±7,01*	84,29±8,61**
Ядерно-цитоплазматический индекс	0,22±0,02	0,27±0,01*	0,34±0,02**
Количество двуядерных гепатоцитов на 1 мм ²	234,43±9,92	380,97±10,15 *	484,0±35,71**

Примечание: $p < 0,05$ * с группой сравнения; $p < 0,05$ ** с контрольной группой.

На 7 сутки наблюдения морфометрические показатели лабораторных мышей в опытной группе сохраняют изменения, найденные на 3 сутки: наблюдается снижение запрограммированной клеточной гибели гепатоцитов, увеличение количества двуядерных гепатоцитов, повышение размеров ядра, возрастание ЯЦИ. Увеличение количества двуядерных гепатоцитов можно объяснить

тем, что в ранние сроки репаративной регенерации значительная часть митозов является ацитокинетическими. Также на 7 сутки после частичной гепатэктомии сохраняется повышенная митотическая активность, способствующая восстановлению массы печени. Отмечено повышение активности ферментов репарации ДНК, что ведет к снижению количества гепатоцитов с микроядрами (табл. 2).

Таблица 2

Морфофункциональная характеристика репаративных процессов в печени мышей на 7 сутки после частичной гепатэктомии

Показатели	Значение		
	NaCl (группа сравнения)	NaCl (контрольная группа)	ММСК+ЗКП (опытная группа)
Масса печени, г	1,76±0,13	1,15±0,09*	1,48±0,09**
Апоптотический индекс, ‰	0,39±0,03	1,25±0,09 *	0,89±0,08**
Количество гепатоцитов с микроядрами, ‰	2,18±0,11	2,77±0,23*	2,14±0,18**
Митотический индекс, ‰	0,73±0,06	4,51±0,47 *	5,80±0,37**
Активность ферментов семейства PARP в клетках печени, MFI	45,2±4,1	59,3±5,21*	86,3±8,06**
Количество гепатоцитова на 1 мкм ²	1538,14±103,59	1427,71±116,98	1354,0±138,0
Площадь гепатоцита (мкм ²)	264,66±5,87	286,41±22,44	292,57±20,94
Площадь цитоплазмы гепатоцита (мкм ²)	214,21±8,10	223,03±17,97	212,21±13,88
Площадь ядра гепатоцита (мкм ²)	50,46±3,29	63,39±5,12 *	80,36±7,08**
Ядерно-цитоплазматический индекс	0,24±0,02	0,29±0,02 *	0,38±0,02**
Количество двуядерных гепатоцитов на 1 мм ²	237,29±8,24	320,77±10,64 *	404,71±27,47**

Примечание: $p < 0,05$ * с группой сравнения; $p < 0,05$ ** с контрольной группой.

Проведение частичной гепатэктомии сопровождается значительным повышением уровня фактора роста гепатоцитов в сыворотке крови на 3 сутки после операции. Проведение сочетанной трансплантации ММСК и ЗКП приводит к еще большему увеличению уровня HGF (на 32% по сравнению с показателем контрольной группы). На 7 сутки после частичной гепатэктомии также отмечается эффект от проведенной трансплантации клеток. Содержание HGF в опытной группе животных было на 57% ($p < 0,05$) выше по сравнению с контрольной группой.

При анализе биохимических показателей крови на 3 сутки в опытной группе снижается активность ферментов, характеризующих цитолиз и холестаза (альбумина, АСТ, АЛТ, ЩФ) с одновременным повышением концентрации мочевины (табл. 4).

Таблица 3
Содержание HGF в сыворотке крови

Сутки после операции	Значение		
	NaCl (группа сравнения)	NaCl (контрольная группа)	ММСК+ЗКП (опытная группа)
3 сутки	4,22±0,35	18,21±1,76*	24,12±2,36* **
7 сутки	4,49±0,39	10,58±0,88*	16,7±2,62* **

Примечание: $p < 0,05$ * с группой сравнения; $p < 0,05$ ** с контрольной группой.

Таблица 4
Биохимические показатели крови мышей на 3 сутки после частичной гепатэктомии

Показатели	Значение		
	NaCl (группа сравнения)	NaCl (контрольная группа)	ММСК+ЗКП (опытная группа)
Общий белок (г/л)	68,31±3,93	50,03±4,82*	53,67±4,34*
Альбумин (г/л)	30,84±4,25	19,80±2,51*	22,01±2,04*
Мочевина (ммоль/л)	6,21±0,87	4,37±0,33*	5,26±0,29* **
Аспаратаминотрансфераза (Е/л)	97,26±8,47	209,53±13,85*	156,97±13,35* **
Аланинаминотрансфераза (Е/л)	81,13±8,66	155,24±9,38*	114,16±13,53* **
Щелочная фосфатаза (Е/л)	66,34±5,24	106,67±10,45*	83,47±8,40* **
Глюкоза (ммоль/л)	5,73±0,69	3,66±0,29*	3,87±0,32*
Общий билирубин (мкмоль/л)	8,90±1,14	21,99±5,47*	20,13±1,61*
Фибриноген (г/л)	3,27±0,18	2,27±0,26*	2,67±0,22*

Примечание: $p < 0,05$ * с подгруппой сравнения; $p < 0,05$ ** с контрольной группой.

На 7 сутки после частичной гепатэктомии в опытной группе повышается содержание общего белка, альбумина, при этом уровень общего белка и альбумина достигает значений группы сравнения. Также наблюдается повышение мочевины, снижение уровня ферментов цитолиза (АСТ, АЛТ) и холестаза (ЩФ), и уровень ферментов аналогичен

группе сравнения. Также выявлено повышение уровня глюкозы и фибриногена (табл. 5).

Таким образом, проведенные исследования позволили установить положительный эффект сочетанной трансплантации ММСК и ЗКП на морфофункциональное состояние печени после частичной гепатэктомии.

Таблица 5
Биохимические показатели крови мышей на 7 сутки после частичной гепатэктомии

Показатели	Значение		
	NaCl (группа сравнения)	NaCl (контрольная группа)	ММСК+ЗКП (опытная группа)
Общий белок (г/л)	66,46±4,36	44,27±3,62*	60,27±5,09**
Альбумин (г/л)	31,41±3,38	20,59±1,90*	28,06±2,16**
Мочевина (ммоль/л)	6,11±0,61	4,57±0,46*	5,63±0,35**
Аспаратаминотрансфераза (Е/л)	104,56±9,07	153,86±16,96*	111,21±10,01**
Аланинаминотрансфераза (Е/л)	89,23±4,43	137,10±16,29*	95,50±8,57 **
Щелочная фосфатаза (Е/л)	63,30±4,00	83,11±5,93*	65,61±4,36**
Глюкоза (ммоль/л)	6,44±0,62	4,30±0,29*	5,20±0,34* **
Общий билирубин (мкмоль/л)	9,37±0,65	15,41±2,76*	13,70±0,83*
Фибриноген (г/л)	3,20±0,23	2,20±0,23*	2,87±0,24**

Примечание: $p < 0,05$ * с группой сравнения; $p < 0,05$ ** с контрольной группой.

ОБСУЖДЕНИЕ

В ранее выполненных нами исследованиях было установлено, что трансплантация только плацентарных ММСК способна активировать регенерацию печени после частичной гепатэктомии [27]. В настоящей работе было изучено влияние сочетанной трансплантации ММСК и ЗКП на восстановление морфофункциональных показателей печени после частичной гепатэктомии. Полученные данные свидетельствуют о преимуществе сочетанной трансплантации данных видов клеток при частичной гепатэктомии. Так, после введения ММСК наблюдалось повышение массы печени лишь на 7 сутки и не восстанавливалась белково-синтетическая функция печени [27, 28]. В настоящем исследовании установлено, что сочетанная трансплантация ММСК и ЗКП обеспечивает повышение массы печени уже на 3 сутки, а на 7 сутки она восстанавливается до значений контрольной группы за счет повышения митотической активности гепатоцитов и снижения запрограммированной клеточной гибели.

Есть данные, свидетельствующие об эффективности трансплантации ЗКП при частичной гепатэктомии. При этом установлены механизмы участия этих клеток в активации репаративной регенерации. Авторами было показано, что на 1 сутки эти клетки реализуют свое действие через паракринный механизм, а на 3 сутки — путем дифференцировки в гепатоциты [19]. Полученный в настоящем исследовании положительный эффект от проведенной сочетанной трансплантации клеток можно объяснить способностью ЗКП вырабатывать фактор роста гепатоцитов, который является мощным митогеном для гепатоцитов, способствуя активации клеточной и внутриклеточной регенерации [6, 7].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александров, В. Н. Клеточные технологии и путь в клинику / В. Н. Александров, А. С. Бунтовская, А. А. Кокорина [и др.] // Известия Российской Военно-медицинской академии. – 2018. – Т. 37, № 4. – С. 9–14.
2. Prockop, D. J. The exciting prospects of new therapies with mesenchymal stromal cells / D. J. Prockop // *Cytherapy*. – 2017. – Vol. 19, № 1. – P. 1–8.
3. WHO. World health statistics 2016: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. WorldHealthOrganization, Geneva. – 2016.
4. Underestimation of liver-related mortality in the United States / K. Asrani, J. J. Larson, B. Yawn [et al.] // *Gastroenterology*. – 2013. – Vol. 145, № 2. – P. 375–382.
5. Изменения микроструктуры печени после частичной гепатэктомии у крыс / И. М. Газизов, М. С. Калигин, Д. И. Андреева [и др.] // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. – 2013. – Т. 8, № 3. – С. 101–105.
6. Регуляция пролиферации гепатоцитов после субтотальной резекции печени крыс / А. В. Ельчанинов, А. В. Макаров, И. Г. Воробьева [и др.] // *Гены & Клетки*. – 2018. – Т. XIII, № 4. – С. 37–42.
7. Экспериментальные модели острой печеночной недостаточности / В. С. Рудаков, С. Э. Восканян, И. И. Еремин [и др.] // *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. – 2015. – № 4. – С. 138–144.
8. Alwahsh, S. M. Liver cell therapy: is this the end of the beginning? / S. M. Alwahsh, H. Rashidi, D. C. Hay // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2018. – Vol. 75 (8). – P. 1307–1324.
9. Boyd, A. The role of stem cells in liver injury and repair / A. Boyd, Ph. Newsome, W. Lu // *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology*. – 2019. – Vol. 13 (7). – P. 623–531.
10. Forbes, S. J. Liver Regeneration – Mechanisms and Models to Clinical Application / S. J. Forbes, Ph. N. Newsome // *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. – 2016. – Vol. 13 (85). – P. 473–485.
11. Mesenchymal Stem Cells: Cell Therapy and Regeneration Potential / Ch. Brown, Ch. McKee, Sh. Bakshi [et al.] // *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. – 2019. – Vol. 13 (9). – P. 1738–1755.
12. Mesenchymal Stem Cells: Identification, Phenotypic Characterization, Biological Properties and Potential for Regenerative Medicine Through Biomaterial Micro-Engineering of Their Niche / J. Kobilak, A. Dinnyes, A. Memic [et al.] // *Methods in Cell Science*. – 2016. – Vol. 99. – P. 62–68.
13. Влияние трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток на морфометрические показатели печени зрелых и старых лабораторных животных в условиях токсического гепатита / И. Ю. Маклакова, Д. Ю. Гребнев, В. Ч. Юсупова, Е. М. Петрунина // *Морфология*. – 2020. – Т. 157, № 1. – С. 55–60.
14. Hu, C. Preconditioning influences mesenchymal stem cell properties in vitro and in vivo / C. Hu, L. Li. // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. – 2018. – Vol. 22 (3). – P. 1428–1442.
15. Mesenchymal stromal cell therapy for liver diseases / M. Alfaifi, Y. W. Eom, P. N. Newsome [et al.] // *Journal of Hepatology*. – 2018. – Vol. 68. – P. 1272–1285.
16. Маклакова, И. Ю. Коррекция морфофункционального состояния печени при остром гепатите с помощью стволовых клеток / И. Ю. Маклакова, Д. Ю. Гребнев // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. – 2020. – № 64 (2). – С. 46–53.

Выявленное в настоящем исследовании изменение биохимических показателей крови — нормализация содержания ферментов цитолиза (АСТ, АЛТ) и холестаза (ЩФ) — можно объяснить способностью ММСК к выработке противовоспалительных факторов [29, 30].

Проведенные исследования также позволяют установить механизм снижения количества гепатоцитов с микроядрами, которые, как известно, отражают уровень патологических митозов. В свою очередь, уменьшение клеток с микроядрами может быть обусловлено выявленной активацией системы репарации ДНК. Ферменты репарации ДНК семейства PARP, исправляя повреждения в структуре ДНК, вызывают снижение запрограммированной клеточной гибели, уменьшают количество патологических митозов.

ВЫВОДЫ

Аллогенная сочетанная трансплантация мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из хориона плаценты, и звездчатых клеток печени способствует активации регенерации печени. Этот эффект проявляется в активации механизмов клеточной регенерации (повышение митотической активности гепатоцитов, ингибирование запрограммированной клеточной гибели), уменьшении количества патологических митозов, увеличении количества двуядерных гепатоцитов.

Проведенные исследования свидетельствуют о способности сочетанной трансплантации ММСК и ЗКП обеспечивать восстановление морфофункционального состояния печени после частичной гепатэктомии и дают основание для проведения пилотных клинических исследований.

17. Маклакова, И. Ю. Влияние сочетанной трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных и гемопоэтических стволовых клеток на регенерацию гемопоэтической ткани / И. Ю. Маклакова, Д. Ю. Гребнев // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2017. – Т. 163, № 1. – С. 73 – 77.
18. Christ B. The Therapeutic Promise of Mesenchymal Stem Cells for Liver Restoration / B. Christ, S. Brückner, S. Winkler // Trends in Molecular Medicine. – 2016. – Vol. 21 (11). – P. 673–686.
19. Трансплантированные звездчатые клетки печени участвуют в регенерации органа после частичной гепатэктомии без риска развития фиброза печени / Шафигуллина А. К., Гумерова А. А., Трондин А. А. [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Том VII, № 3.
20. Gazdic, M. Mesenchymal Stem Cell-Dependent Modulation of Liver Diseases / M. Gazdic, A. Arsenijevic, B. Markovic // Int J Biol Sci. – 2017. – Vol. 13 (9). – P. 1109–1117.
21. Hepatic stellate cells stimulate hepatocyte differentiation of rat's bone marrow derived mesenchymal stem cells in vitro / Gumerova A. A., Shafiguullina A. K., Trondin A. A. [et al.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Т. 6, № 4. – С. 72–81.
22. Hepatic stellate cells contribute to progenitor cells and liver regeneration / Kordes C., Sawitza I., Gotze S. [et al.] // Journal of Clinical Investigation. – 2014. – Vol. 124 (12). – P. 5503-15. – Doi: 10.1172/JCI74119.
23. Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer / C. Yin, K. J. Evason, K. Asahina, D. Y. Stainier // Journal of Clinical Investigation. – 2013. – Vol. 123, № 5. – P. 1902–1910.
24. Mitchell, C. A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice / C. Mitchell, H. Willenbring // Nature protocols. – 2008. – Vol. 3, № 7. – P. 1167–1171. – Doi: 10.1038/nprot.2014.122.
25. Баглей, Е. А. Изучение генотоксичности ципрофлоксацина в микроядерном тесте на гепатоцитах и эритроцитах костного мозга мышей / Е. А. Баглей, Н. Н. Недопитанская, В. С. Лисовская // Украинский журнал современных проблем токсикологии. – 2014. – № 1-2. – С. 64-65.
26. Flow-cytometric assessment of cellular poly(ADP-ribosyl)ation capacity in peripheral blood lymphocytes / A. Kunzmann, D. Lui, K. Annett [at al.] // Immunity & Ageing. – 2006. – Vol. 3. – P. 8. – Doi: 10.1186/1742-4933-3-8.
27. Оценка морфофункциональных изменений печени после ее резекции на фоне введения мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в условиях старения организма / В. Ч. Вахрушева, И. Ю. Маклакова, Д. Ю. Гребнев [и др.] // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2020. – Т. 17, №1. – С. 89–97. – Doi: 10.22138/2500-0918-2020-17-1-89-97.
28. Влияние трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток на биохимические показатели крови после резекции печени у зрелых и старых лабораторных животных / Успехи геронтологии // И. Ю. Маклакова, Д. Ю. Гребнев, В. Ч. Юсупова [и др.]. – 2018. – Т.31, № 6. – С. 933–936.
29. Caplan, A. I. Mesenchymal stem cells: time to change the name! / A. I. Caplan // Stem Cells Translational Medicine. – 2017. – Vol. 6, №. 6. – P. 1445–1451.
30. Вахрушева В. Ч. Патолофизиологическое обоснование использования плацентарных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток при повреждении печени в зрелом и старом организме : дис. ... кандидата мед. наук : 14.03.03 Патологическая физиология / Вахрушева Виктория Чаукатовна; Уральский государственный медицинский университет. – Екатеринбург, 2020 – 175 с.

Сведения об авторах

Маклакова Ирина Юрьевна, к.м.н.
ФГБОУ ВО «УГМУ» Минздрава России,
г. Екатеринбург, Россия.
ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», г. Екатеринбург, Россия.
Email: makliu@mail.ru

Гребнев Дмитрий Юрьевич, д.м.н.
ФГБОУ ВО «УГМУ» Минздрава России,
г. Екатеринбург, Россия.
ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», г. Екатеринбург, Россия
Email: dr-grebnev77@mail.ru

Осипенко Артур Васильевич, д.м.н., профессор
ФГБОУ ВО «УГМУ» Минздрава России,
г. Екатеринбург, Россия.
Email: given1@yandex.ru

Information about the authors

Irina Yu. Maklakova, PhD
Ural State Medical University,
Ekaterinburg, Russia.
Institute of medical cell technologies,
Ekaterinburg, Russia.
Email: makliu@mail.ru

Dmitry Yu. Grebnev, PhD
Ural State Medical University,
Ekaterinburg, Russia.
Institute of medical cell technologies,
Ekaterinburg, Russia.
Email: dr-grebnev77@mail.ru

Artur V. Osipenko, PhD, Professor
Ural State Medical University,
Ekaterinburg, Russia.
Email: given1@yandex.ru