

DOI: 10.15825/1995-1191-2022-4-85-93

АПОПТОТИЧЕСКИЕ МОНОНУКЛЕАРНЫЕ КЛЕТКИ КОСТНОГО МОЗГА УСКОРЯЮТ РЕГЕНЕРАЦИОННЫЕ ПРОЦЕССЫ В ПЕЧЕНИ ПОСЛЕ ОБШИРНОЙ РЕЗЕКЦИИ

Н.А. Онищенко¹, А.О. Никольская¹, З.З. Гоникова¹, Л.А. Кирсанова¹, М.Ю. Шагидулин^{1, 2}, 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

Цель: на модели обширной резекции печени (ОРП) сравнить эффективность регенерационных процессов в печени при использовании апоптотических моноклеарных клеток костного мозга (аМККМ) и интактных моноклеарных клеток костного мозга (иМККМ) от здоровых животных. **Материалы и методы.** Крыс-самцов породы Вистар ($n = 77$) с моделью ОРП (70–75%) разделили на 3 группы: группа 1 – контроль с однократным внутривенным введением физиологического раствора, группа 2 – с однократным внутривенным введением несортированных иМККМ в дозе $30\text{--}35 \times 10^6$ и группа 3 – с однократным внутривенным введением аМККМ в той же дозе. В динамике контролировали восстановление биохимических показателей функции и массы печени, а также возникающие микроструктурные изменения гепатоцитов в гистологических препаратах, оценивая митотическую активность гепатоцитов в течение первых 7–10 дней после ОРП. **Результаты.** Установлено, что в группе 2 и в группе 3 по сравнению с группой 1 отсутствовала летальность после моделирования ОРП, а также имела место более быстрая нормализация биохимических показателей функции печени (к 10–14-м суткам). Митотическая активность гепатоцитов в группе 3 резко возрастала уже на 1-е сутки, и митотический индекс (МИ) в среднем составлял 14%, достигая в отдельных экспериментах 20,9%; в контроле к этому сроку МИ оставался на исходном уровне, а в группе 2 МИ составил только 3,2%. В группе 3 отмечено также более быстрое восстановление массы печени после ОРП до исходных значений уже к 8–10-м суткам, тогда как в группе 2 – к 12–14-м суткам, а в группе 1 – к 17–20-м суткам. Было высказано предположение, что более выраженное повышение эффективности регенерационных процессов в печени после ОРП в группе 3 после применения аМККМ обусловлено высвобождением из этих клеток большого спектра образовавшихся паракринных факторов, в том числе различных классов молекул РНК, участвующих в регенерационном процессе. **Заключение.** аМККМ обладают более эффективным адаптивным и регуляторным потенциалом по сравнению с иМККМ, т. к. ускоренно формируют в клетках поврежденной печени перестройки, обеспечивающие более раннее и мощное включение адресной регенерационной программы.

Ключевые слова: апоптотические клетки костного мозга, регенерация, резекция печени.

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

АПОПТОТИЧЕСКИЕ КОСТНО-ПОДСИМОВЫЕ МОНОЯДЕРНЫЕ КЛЕТКИ УСКОРЯЮТ РЕГЕНЕРАЦИЮ ПЕЧЕНИ ПОСЛЕ РАСШИРЕННОЙ РЕЗЕКЦИИ

N.A. Onishchenko¹, A.O. Nikolskaya¹, Z.Z. Gonikova¹, L.A. Kirsanova¹, M.Yu. Shagidulin^{1, 2}, V.I. Sevastianov¹

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

² Sechenov University, Moscow, Russian Federation

Objective: to compare the efficiency of regenerative processes in the liver using apoptotic bone marrow-derived mononuclear cells (BMMCs) and intact BMMCs from healthy animals on an extended liver resection (ELR) model. **Materials and methods.** Male Wistar rats (n = 77) with an ELR model (70–75%) were divided into 3 groups: group 1 (control with a single intraperitoneal injection of saline), group 2 (single intraperitoneal injection of unsorted intact BMMCs at a dose of $30\text{--}35 \times 10^6$, and group 3 (single intraperitoneal injection of apoptotic BMMCs at the same dose). Restoration of biochemical parameters of liver function and mass, as well as the emerging microstructural changes in hepatocytes in histological preparations, were monitored by assessing hepatocyte mitotic activity (MA) during the first 7–10 days after ELR. **Results.** It was found that in groups 2 and 3, as compared with group 1, there was no death after ELR modeling, and that the biochemical parameters of liver function normalized more rapidly (at days 10–14). Hepatocyte MA in group 3 sharply increased as early as on day 1, and mitotic index (MI) averaged 14%, reaching 20.9% in some experiments; MI in the control group remained at the baseline by this time, while in group 2, MI was only 3.2%. In group 3, liver mass recovered more rapidly after ELR to baseline values already at days 8–10, whereas the recovery was at day 12–14 and day 17–20 in group 2 and group 1, respectively. It was suggested that the more pronounced increase in the efficiency of regenerative processes in the liver after ELR in group 3 after using apoptotic BMMCs was due to the release from these cells of a large spectrum of formed paracrine factors, including various classes of RNA molecules involved in the regeneration process. **Conclusion.** Apoptotic BMMCs have a more effective adaptive and regulatory potential than intact BMMCs because reorganizations are rapidly formed in the damaged liver cells, providing an early and more powerful activation of the targeted regenerative program.

Keywords: apoptotic bone marrow cells, regeneration, liver resection.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что повреждение печени, как и других органов, стимулирует в них адаптационные процессы, которые, в свою очередь, активируют эволюционно запрограммированные механизмы восстановительной регенерации. Между тем при тяжелом хроническом или обширном остром повреждении печени (в условиях гибели значительной массы клеток) оставшиеся клетки вынуждены выполнять свои функции с повышенной нагрузкой, превышающей эволюционно запрограммированную норму расхода клеточной энергии на эти процессы.

В создавшихся условиях за счет развивающегося энергодефицита в клетках печени резко тормозится включение механизмов восстановительной регенерации, что, как полагают, является следствием недостаточной эффективности процессов адаптации, энергетически обеспечивающих регенерационный процесс.

По современным представлениям, адаптивная перестройка метаболизма в тканях начинается с развития в них процессов клеточной аутофагии [1–3]. Поэтому исходно сниженный уровень активности клеточной аутофагии в органе предопределяет низ-

кий регенерационный потенциал оставшихся клеток и недостаточную эффективность восстановительных процессов [4–6]. Для активации регенерационных процессов в поврежденных органах было предложено использовать гемопоэтические и стромальные клетки костного мозга (ККМ), обладающие, как известно, в организме наиболее высоким регенерационным потенциалом. Однако опыт клинического применения ККМ оказался не столь убедительным и не всегда воспроизводимым [7, 8], что заставило исследователей приступить непосредственно к изучению механизмов индукции регенерационных процессов, вызванных ККМ, для повышения терапевтической эффективности их применения. Была выдвинута гипотеза об определяющей регуляторной роли апоптотически измененных ККМ, продуцирующих паракринные факторы в состоянии апоптоза [9]. Справедливость этой гипотезы впоследствии была доказана [10] и многократно подтверждена [11, 12]. К настоящему времени уже утвердилось мнение, что именно апоптотические клетки выделяют в организм рост-стимулирующие сигналы в виде нановезикул [13], липидов [14], экзосом, различных микро-РНК, белков [15] и других компонентов, име-

нуемых секретами. В результате происходит не только ускорение восстановительных процессов в организме, но и повышается их эффективность путем иммуномодулирующего воздействия и блокирования воспалительных реакций [16, 17].

Существующие представления о механизмах индукции регенерационных процессов позволяют предположить, что для выработки в поврежденном органе эффективного регенерационного ответа клеток сила воздействия адаптирующего стресс-сигнала должна быть достаточно высокой, чтобы усилить выраженность процесса аутофагии и даже достигнуть клетками состояния обратимого апоптоза, но не должна превышать эволюционно запрограммированный ответ, т. е. быть физиологичной. Такими свойствами – адекватного и физиологичного адаптогена, – очевидно, и обладают апоптотические ККМ, которые, как было уже показано [11], обеспечивают в организме обновление и восполнение клеточного состава крови и иммунной системы.

Целью настоящего исследования явилось изучение возможности повышения регенерационной активности клеток печени после обширной резекции путем применения в качестве адаптирующего и регуляторного стресс-сигнала апоптотических мононуклеарных ККМ (аМККМ) здорового донора.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на крысах-самцах породы Wistar весом 250–300 г ($n = 77$). Животных содержали в условиях вивария при температуре 18–20 °C на смешанном рационе питания при свободном доступе к воде. Эксперименты на животных проводились в утренние часы при комнатной температуре ($t = 22–24$ °C), что исключало влияние суточных колебаний митотической активности клеток печени. Относительная влажность равнялась 50–65%, цикл освещения был двенадцатичасовым, а смена объема воздуха помещения в час была десятикратной. Питание животных осуществляли стандартным комбинированным кормом для лабораторных животных (микробиологический статус соответствовал ГОСТ Р 51849-2001 «Ветеринарно-санитарные нормы и требования к качеству кормов для непродуктивных животных»). Фильтрованная водопроводная вода *ad libitum* доставлялась в стандартных питьевых бутылочках (микробиологический статус воды соответствовал СанПиН 2.1.4.1074-01 «Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения»). Эксперименты и все манипуляции с животными проводились согласно правилам, принятым Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследований и других научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals

Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123), Strasbourg, 1986).

Способность аМККМ усиливать регенерационные сигналы и адресно доставлять их в ткань поврежденной печени изучали на модели обширной (70–75%) резекции печени (ОРП) у крыс, которая сопровождается активацией механизмов гипертрофической регенерации с выраженной митотической активностью гепатоцитов в оставшейся части органа [18].

Перед моделированием ОРП оперируемых крыс ($n = 65$) наркотизировали ингаляционно диэтиловым эфиром, затем с соблюдением правил асептики и антисептики вскрывали брюшную полость, вывели 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 и последующие исследования всегда проводили 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.

Для доказательства возможности усиления регенерационной активности клеток в поврежденной печени с помощью аМККМ использовали в качестве доноров здоровых крыс без ОРП ($n = 12$). Из костного мозга этих крыс получали несортированную мононуклеарную (гемопозитическую) фракцию клеток для последующего введения в дозе $30–35 \times 10^6$ клеток крысам с ОРП. Все животные после ОРП были разделены на 3 группы: группа 1 – контрольная ($n = 25$), в которой крысам однократно внутрибрюшинно вводили по 1,0–1,5 мл физиологического раствора; группа 2 ($n = 25$) и группа 3 ($n = 15$) – опытные, в которых через 3–5 часов после моделирования ОРП однократно внутрибрюшинно вводили несортированные мононуклеарные ККМ ($30–35 \times 10^6$ клеток в 1,5 мл физиологического раствора), причем в группе 2 – свежeweделенные интактные (иМККМ), а в группе 3 – аМККМ. аМККМ получали путем инкубации свежeweделенных МККМ в консервирующем ион-сбалансированном растворе Кустодиол (раствор НТК – Бредшнейдера) при температуре 4–6 °C в течение 48 часов, т. к., согласно нашим исследованиям [19], при указанных режимах хранения содержание аМККМ (клеток-секретом) в состоянии раннего обратимого апоптоза было достоверно выраженным и достигало $44,8 \pm 0,9\%$, а содержание аМККМ в состоянии позднего необратимого апоптоза в составе клеточного пула не превышало 2–8% ($p < 0,02$).

Динамику восстановления печеночного гомеостаза в организме крыс после ОРП и введения ККМ (интактных и апоптотических) исследовали стан-

дартными методами на биохимическом анализаторе Arik-test (Германия) по содержанию в сыворотке крови в раннем послеоперационном периоде (в течение 14 суток) общего количества белка и билирубина. Также измеряли активность печеночных ферментов цитолиза: аланиновой аминотрансферазы (АлАТ), аспарагиновой аминотрансферазы (АсАТ) и щелочной фосфатазы (ЩФ). Оценивали темп преодоления критической массы остатка печени и восстановления его до исходных значений после ОРП в течение 20–22 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 результатов взвешивания 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.

Степень выраженности индукционного воздействия ОРП на восстановительные процессы в печени при моделировании критической травмы (группа 1), а также изменение характера восстановительных процессов в печени после ОРП на фоне введения иМККМ (группа 2) и аМККМ (группа 3) определяли количественно по степени изменения микроструктурного состояния клеток печени в гистологических препаратах. Для этого в группах 1, 2 и 3 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 указанные сроки иссекали печень и готовили из нее гистологические препараты, окрашивая тканевые срезы гематоксилином и эозином. Проводили гистологический анализ препаратов (микроскоп фирмы Leica DM, Германия), а также определение в 30 полях зрения количества делящихся гепатоцитов с последующим расчетом митотического индекса (МИ) в промилле (‰).

Достоверность различия исследуемых показателей в сравниваемых группах оценивали с помощью параметрического критерия Стьюдента при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнительное исследование восстановления показателей печеночного гомеостаза в 3 группах показало, что в контрольной группе 1 из 25 крыс погибло 5 животных в течение первых 5 суток после резекции печени (летальность составила 20%). В опытных группах 2 и 3 (введение иМККМ ($n = 25$) и аМККМ ($n = 15$) соответственно) погибших животных не было в течение всего срока наблюдения. Отсутствие летальности в этих группах сопровождалось более высоким темпом восстановления печеночного гомеостаза в организме, что выражалось

в более ранней нормализации показателей общего белка и цитолитических ферментов (АлАТ, АсАТ и ЩФ) в сыворотке крови по сравнению с группой 1.

Установлено, что у крыс 2-й и 3-й групп показатели цитолиза, как и в группе 1, нарастали в течение первых 3 суток, но затем в группе 3 более резко, чем в группе 2, стабилизировались и восстанавливались уже к 10–14-м суткам. Сниженный уровень общего белка после ОРП в этих группах также восстанавливался к концу срока наблюдения (14-е сутки), тогда как в контрольной группе нормализации всех исследуемых показателей не наступало к концу срока наблюдения. Более высокий темп восстановления печеночного гомеостаза в организме в группах 2 и 3 по сравнению с контролем можно объяснить более высокой активностью восстановительных и пролиферативных процессов в клетках оставшейся части печени, которая была обусловлена введением иМККМ и аМККМ. Действительно, при сравнительном изучении митотической активности гепатоцитов в печени после ОРП во всех трех исследуемых группах было установлено быстрое повышение митотической активности гепатоцитов по сравнению с исходным уровнем (до ОРП митотический индекс – МИ составлял 0,2–0,3‰). При этом темп развития и степень выраженности подъема митотической активности во 2-й и 3-й группах были выше, чем в контрольной группе (рис. 1).

Так, в группе 1 (контроль) значение митотического индекса достигало максимума 5,378‰ (36 ми-

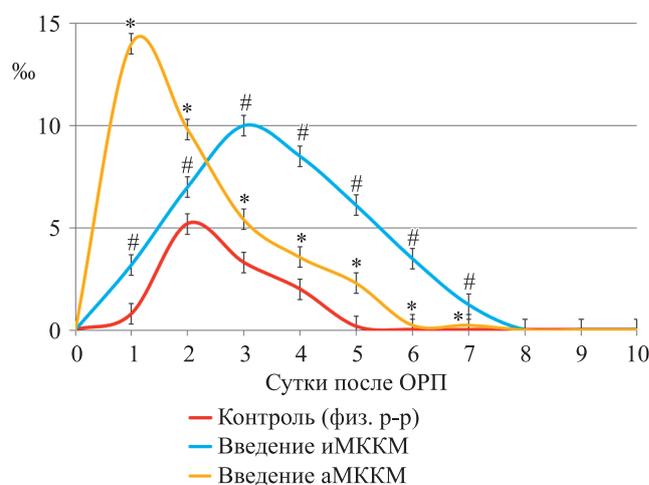


Рис 1. Динамика изменения митотического индекса (МИ) гепатоцитов в печени крыс после обширной резекции печени (‰) в 3 группах опытов. * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем; # – $p < 0,05$ по сравнению с введением аМККМ

Fig. 1. Changes in mitotic index in hepatocytes in the liver of rats after ELR (%) in 3 experimental groups. * – $p < 0.05$ compared to control; # – $p < 0.05$ compared to injection of apoptotic BMMCs

тозов на 6653 клетки) через 48 часов после ОРП. В группе 2 МИ через 48 часов составлял 6,11% (60 митозов на 8448 клеток) с максимумом 10,5% через 72 часа (93 митоза на 8858 клеток). В группе 3 значения МИ достигали максимума уже через 24 часа после моделирования ОРП. В среднем это составляло 14% (135 митозов на 9762 клеток), но в отдельных экспериментах МИ достигал 20,9%. Таким образом, из максимальных значений МИ в трех исследуемых группах следует, что аМККМ практически в 1,5 раза повышают митотическую активность гепатоцитов по сравнению с введением иМККМ и почти в 3 раза повышают митотическую активность гепатоцитов по сравнению с контролем. Важно отметить, что аМККМ не только более интенсивно, но и ускоренно реализуют свой регуляторный эффект

(уже через 24 часа после моделирования ОРП) по сравнению с контролем и применением свежeweыделенных ККМ. Этот факт может быть обусловлен тем, что аККМ сразу после введения в организм обеспечивают доставку и продукцию уже образовавшегося в апоптотических клетках комплекса многочисленных рост-стимулирующих сигнальных молекул и регуляторных факторов [20], которые обеспечивают более раннюю интенсивную активацию восстановительных и пролиферативных процессов в очаге повреждения. Максимально высокую и раннюю активацию митотической активности гепатоцитов в ткани печени после моделирования ОРП и применения аМККМ демонстрирует также рис. 2.

Видно, что через 24 часа только в группе 3 при введении аМККМ (рис. 2, г) наступала ранняя

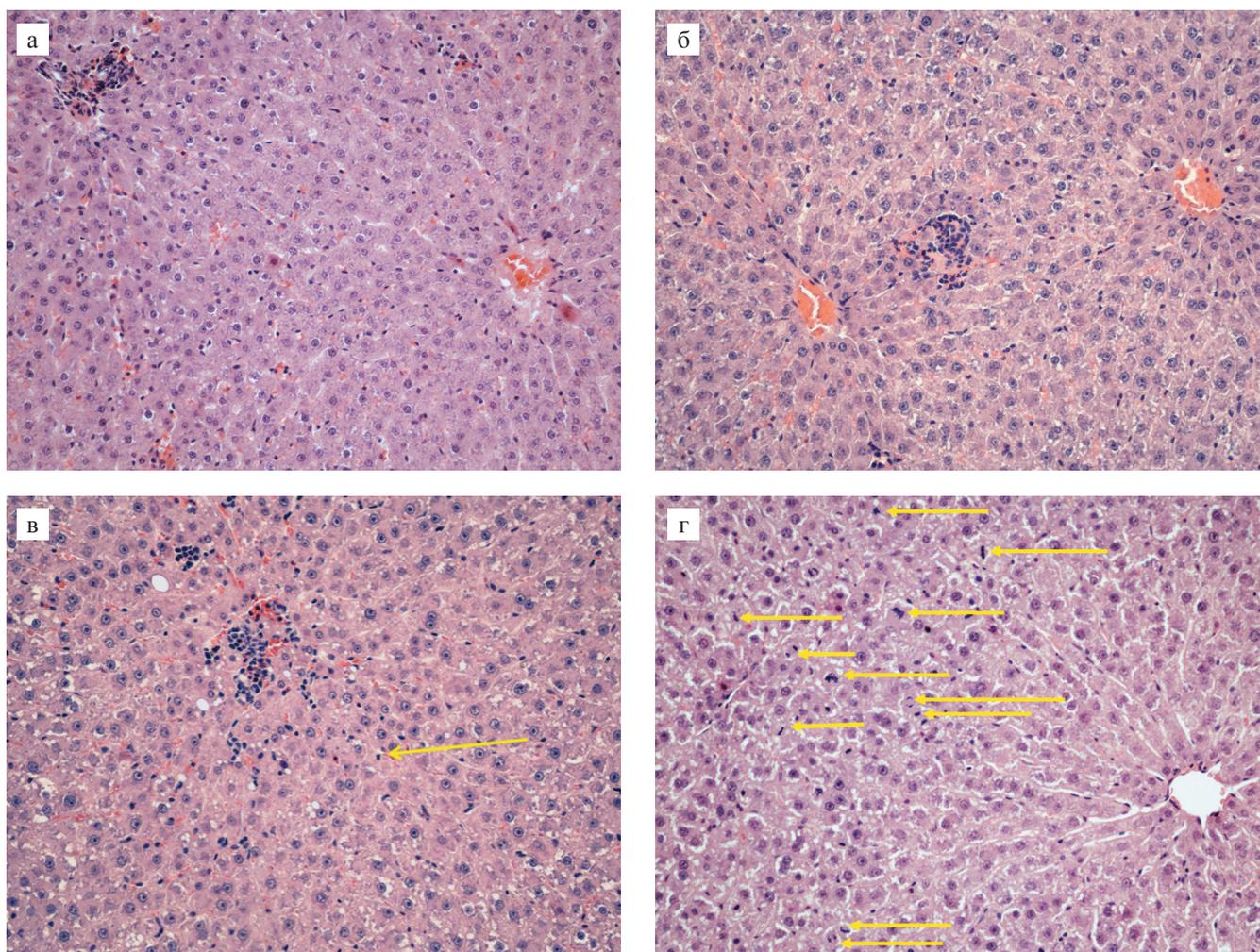


Рис. 2. Митотическая активность гепатоцитов в печени крыс до и через 24 часа после ОРП и введения МККМ: а – исходный уровень (до ОРП); б – группа 1 (контроль), введение физиологического раствора; в – группа 2, введение иМККМ; г – группа 3, введение аМККМ. Стрелками указаны гепатоциты на разных стадиях митоза. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$

Fig. 2. Hepatocyte mitotic activity in rat liver before and 24 hours after ELR and injection of BMMCs: a – baseline (before ELR); б – group 1 (control), saline injection; в – group 2, injection of intact BMMCs; г – group 3, injection of apoptotic BMMCs. Arrows indicate hepatocytes at different stages of mitosis. H&E stain, 200 \times magnification

и максимальная активация митотической активности гепатоцитов, тогда как в опытах с применением свежеработанных иМККМ (рис. 2, в) митотическая активность только начинала усиливаться. В контроле (рис. 2, б) с введением физиологического раствора митотическая активность на этом сроке вообще отсутствовала, но максимально усиливалась только через 48 часов. Кроме того, в клетках печени крыс в группах 2 и 3 через 24 часа после моделирования ОРП появляются признаки диффузной мелкокапельной вакуольной дистрофии гепатоцитов, что, как известно [21], является морфологическим маркером развивающейся аутофагии клеток. При этом наибольшая выраженность аутофагии клеток печени (рис. 3)

отмечалась через 48 часов в группе 3 с введением аМККМ (рис. 3, г).

Морфологическое исследование печени подтверждает более выраженную способность аМККМ по сравнению с иМККМ стимулировать в клетках адаптивные изменения на начальных сроках после повреждения для оптимальной энергетической перестройки метаболизма в клетках и раннего запуска восстановительных и митотических процессов в поврежденном органе [2].

Еще одним подтверждением более выраженного индукционного воздействия аМККМ на регенерационные процессы в печени по сравнению с иМККМ служит динамика восстановления массы печени

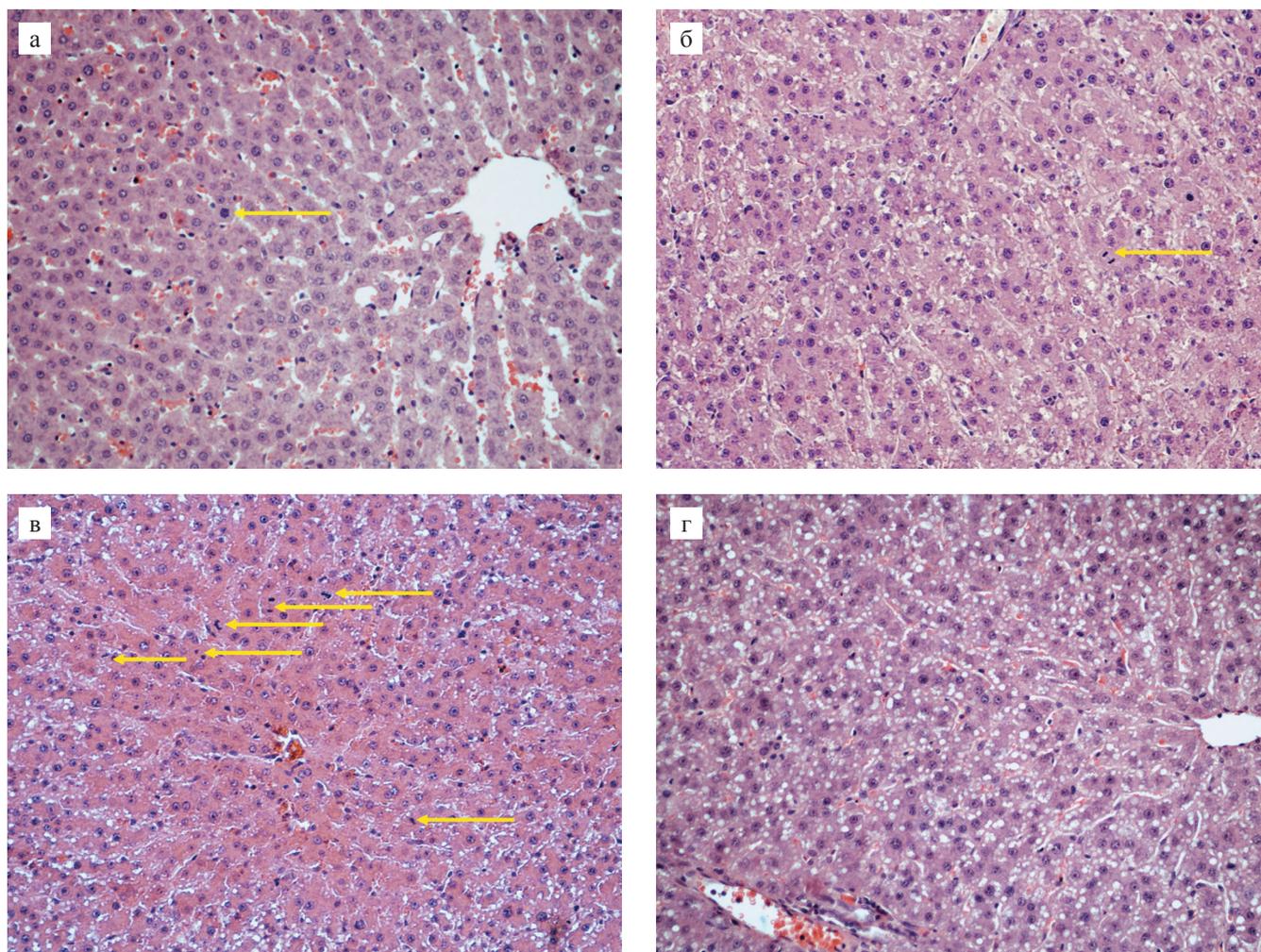


Рис. 3. Гистологическая структура печени крыс до и через 48 часов после моделирования ОРП и введения МККМ. Изменение морфологии гепатоцитов: а – исходное состояние (до ОРП); б – группа 1 (контроль), введение физиологического раствора; в – группа 2, введение иМККМ; г – группа 3, введение аМККМ. Стрелками указаны гепатоциты на разных стадиях митоза. Окраска гематоксилином и эозином, ×200

Fig. 3. Histological structure of the rat liver before and 48 hours after ELR modeling and BMMNC injection. Changes in hepatocyte morphology: а – baseline (before ELR), б – group 1 (control), saline injection; в – group 2, injection of intact BMMNCs; г – group 3, injection of apoptotic BMMNCs. Arrows indicate hepatocytes at different stages of mitosis. H&E stain, 200× magnification

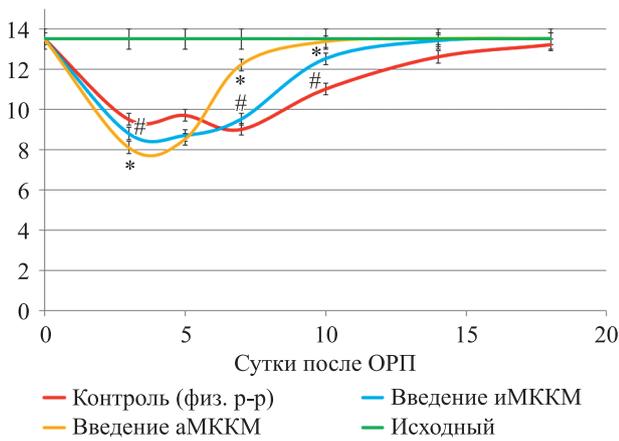


Рис. 4. Динамика восстановления массы печени крыс после ее обширной резекции в 3 группах опытов: с введением физиологического раствора, с введением иМККМ и с введением аМККМ (в граммах). * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем; # – $p < 0,05$ по сравнению с введением аМККМ

Fig. 4. Recovery of rat liver mass after extended resection in 3 experimental groups: with saline injection, with injection of intact BMCMs and with injection of apoptotic BMCMs (in grams). * – $p < 0.05$ compared to control; # – $p < 0.05$ compared to injection of apoptotic BMCMs

в трех исследуемых группах животных с моделированием ОРП (рис. 4).

Наиболее ускоренный темп восстановления массы печени наблюдается в группе 3, где через 3–5 часов после ОРП внутривенно вводили аМККМ в дозе $30\text{--}35 \times 10^6$ клеток. Восстановление массы печени в этой группе наступало к 8–10-м суткам. Введение иМККМ в той же дозе в группе 2 также ускоряло репаративные процессы в остатке резецированной печени, но восстановление массы печени до исходных значений в этой группе происходило на 12–14-е сутки, т. е. восстановление происходило в более замедленном темпе. В группе 1 (контроль) восстановление массы печени при введении физиологического раствора наблюдалось на 17–20-е сутки. Ранее мы показали [22], что внутривенное введение крысам общей РНК в дозе 30 мкг / 100 г веса, полученной из свежесекретированных иМККМ, также интенсифицировало регенеративную активность клеток печени после моделирования ОРП. При этом регенерационный ответ печени на введение общей РНК из иМККМ был выше, чем на введение свежесекретированных иМККМ. Так, при введении общей РНК из иМККМ значение МИ через 48 часов составило 23,4%, а при введении иМККМ – 6,96%, а восстановление массы печени наступало на 10–12-е сутки и на 14–18-е сутки соответственно. Сходство в направленности и более высокой результативности регуляции восстановительных процессов при введении

общей РНК как из свежесекретированных иМККМ, так и из аМККМ – по сравнению со свежесекретированными иМККМ позволяет предположить следующий механизм. В процессе выделения общей РНК из иМККМ эти клетки также подвергаются воздействию апоптоза. Развитие апоптоза клеток, как известно, способствует появлению у таких клеток способности продуцировать многочисленные и разнообразные паракринные факторы, включая различные типы РНК и микроРНК [9, 15]. Накапливающиеся паракринные факторы апоптотических клеток и оказывают дополнительно мощное стресс-регуляторное воздействие на восстановительные процессы в поврежденных органах.

Полученные результаты, по нашему мнению, свидетельствуют о том, что аМККМ, введенные в организм на фоне ОРП, действуют в рамках неспецифического адаптационного синдрома клеточных систем как адекватный эволюционно выработанный адаптоген. Этот адаптоген предназначен включать и оптимизировать резервы выживания клеток в поврежденном органе путем резкого и ускоренного переключения в них эволюционно запрограммированных механизмов гибели клеток (таких как аутофагия и обратимый апоптоз) на пролиферацию клеток. Возможность существования в клетках таких механизмов переключения, находящихся в коактивированном состоянии, обсуждается в работах [23, 24].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из полученных результатов следует:

- на ранних сроках после моделирования обширной резекции печени аМККМ и свежесекретированные иМККМ усиливают митотическую активность клеток печени по сравнению с контролем (введение физиологического раствора). Однако выраженность усиления активационного воздействия на пролиферацию клеток печени при использовании аМККМ существенно выше, чем при использовании иМККМ. При внутривенном введении аМККМ параметр МИ достигает максимальных значений через 24 часа, тогда как при введении иМККМ – только через 72 часа;
- ранняя вакуолизация цитоплазмы гепатоцитов в печени после моделирования ОРП, являющаяся морфологическим маркером аутофагии клеток и отражающая активацию эволюционно запрограммированного процесса их адаптации на повреждение, развивается во всех группах опытов уже через 24 часа, но более интенсивно через 48 часов. Более выраженная ранняя вакуолизация в группе 3 (введение аМККМ) по сравнению с группой 2 (иМККМ) и группой 1 (физиологический раствор) свидетельствует о более высоких регуляторных возможностях аМККМ;

– аМККМ и иМККМ обеспечивают адресную передачу регенерационных сигналов в резецированную печень и ускоряют в ней регенерационный процесс. Однако темп ускорения репаративных процессов и сроки восстановления массы печени до исходных значений при введении аМККМ были выше (8–10-е сутки), чем при использовании иМККМ (12–14-е сутки) и физиологического раствора (18–20-е сутки).

Все вышеизложенное позволяет считать, что аМККМ за счет приобретения ими более мощного регуляторного стресс-индуцированного потенциала в отличие от иМККМ обладают более выраженными адаптирующими и регуляторными свойствами, которые создают в организме более прочный фундамент для осуществления адресной и более эффективной регенерационной программы. Рост интенсивности адаптирующего воздействия аМККМ за счет выделения многочисленных и разнообразных паракринных факторов (в том числе различных типов РНК) способствует ранней и более эффективной активации процессов аутофагии клеток печени после ОРП, которые и индуцируют отчетливое повышение регенерационной активности, а также сокращение сроков восстановления массы резецированной печени до исходных значений.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. 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.
2. 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. https://doi.org/10.1159/000430287.
3. Lv H, Fan X, Wang L, Feng H, Ci X. Daphnetin alleviates lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced acute liver failure via the inhibition of NLRP3, MAPK and NF-κB, and the induction of autophagy. *Int J Biol Macromol*. 2018 Nov; 119: 240–248. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.07.101.
4. Oami T, Watanabe E, Hatano M, Teratake Y, Fujimura L, Sakamoto A et al. Blocking liver autophagy accelerates apoptosis and mitochondrial injury in hepatocytes and reduces time to mortality in a murine sepsis model. *Shock*. 2018 Oct; 50 (4): 427–434. https://doi.org/10.1097/shk.0000000000001040.
5. Shen Y, Malik SA, Amir M, Kumar P, Cingolani F, Wen J et al. Decreased Hepatocyte Autophagy Leads to Synergistic IL-1β and TNF Mouse Liver Injury and Inflammation. *Hepatology*. 2020 Aug; 72 (2): 595–608. doi: 10.1002/hep.31209.
6. Ruart M, Chavarria L, Campreciós G, Suárez-Herrera N, Montironi C, Sergi Guixé-Muntet et al. Impaired endothelial autophagy promotes liver fibrosis by aggravating the oxidative stress response during acute liver injury. *J Hepatol*. 2019 Mar; 70 (3): 458–469. doi: 10.1016/j.jhep.2018.10.015.
7. Carvalho AB, Quintannilha LF, Dias AS et al. Bone marrow multipotent mesenchymal stem cells do not reduce fibrosis or improve function in a rat model of severe chronic liver injury. *Stem Cells*. 2008; 26: 1307–1314. https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143.
8. Dai LJ, Li HY et al. The therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on hepatic cirrhosis. *Stem Cell Res*. 2009; 2 (1): 16–25. https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2007.04.017.
9. Thum T, Bauersachs J, Poole-Wilson PA, Volk HD, Anker SD. The dying stem cell hypothesis: immune modulation as a novel mechanism for progenitor cell therapy in cardiac muscle. *J Am Coll Cardiol*. 2005; 46: 1799–1802. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.07.053.
10. Ankersmit HJ, Hoetzenecker K, Diel W et al. Irradiated cultured apoptotic peripheral blood mononuclear cells regenerate infarcted myocardium. *Eur J Clin Invest*. 2009; 39: 445–456. https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2009.02111.x.
11. Beer L, Mildner M, Gyöngyösi M, Ankersmit HJ. Peripheral blood mononuclear cell secretome for tissue repair. *Apoptosis*. 2016; 21: 1336–1353. doi: 10.1007/s10495-016-1292-8.
12. Gneccchi M, Danieli P, Malpasso G, Ciuffreda MC. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cells in tissue repair. *Methods Mol Biol*. 2016; 1416: 123–146. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3584-0_7.
13. Sirois I, Raymond MA, Brassard N et al. Caspase-3-dependent export of TCTP: a novel pathway for anti-apoptotic intercellular communication. *Cell Death Differ*. 2011; 18: 549–562. https://doi.org/10.1038/cdd.2010.126.
14. Huang Q, Li F, Liu X et al. Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy. *Nat Med*. 2011; 17: 860–866. https://doi.org/10.1038/nm.2385.
15. Beer L, Zimmermann M, Mitterbauer A et al. Analysis of the secretome of apoptotic peripheral blood mononuclear cells: impact of released proteins and exosomes for tissue regeneration. *Sci Rep*. 2015; 5: 16662. https://doi.org/10.1038/srep16662.
16. Gray M, Miles K, Salter D, Gray D, Savill J. Apoptotic cells protect mice from autoimmune inflammation by the induction of regulatory B cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104: 14080–14085. https://doi.org/10.1073/pnas.0700326104.
17. Zhang M, Xu S, Han Y, Cao X. Apoptotic cells attenuate fulminant hepatitis by priming Kupffer cells to produce interleukin-10 through membrane-bound TGF-β. *Hepatology*. 2011; 53: 306–316. https://doi.org/10.1002/hep.24029.

18. Ельчанинов АВ, Фатхудинов ТХ. Регенерация печени млекопитающих: Межклеточные взаимодействия. М.: Наука, 2020; 126. *Yel'chaninov AV, Fatkhudinov TKh. Regeneratsiya pecheni mlekopitayushchikh: Mezhhklochnyye vzaimodeystviya.* М.: Nauka, 2020; 126.
19. Онищенко НА, Фоменко ЕВ, Никольская АО, Гоникова ЗЗ, Шагидулин МЮ, Баясин МВ и др. К механизму активации восстановительных процессов в печени при использовании общей РНК клеток костного мозга. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2020; XXII (3): 134–142. *Onishchenko NA, Fomenko EV, Nikolskaya AO, Gonikova ZZ, Shagidulin MYu, Balyasin MV et al.* Activation of regenerative processes in the liver when using cell-bone marrow total RNA. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs.* 2020; 22 (3): 134–142. <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2020-3-134-142>.
20. Korf-Klingebiel M, Kempf T, Sauer T et al. Bone marrow cells are a rich source of growth factors and cytokines: implications for cell therapy trials after myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2008; 29: 2851–2858. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehn456>.
21. Потаннев МП. Аутофагия, апоптоз, некроз клеток и иммунное распознавание своего и чужого. *Иммунология.* 2014; 2: 95–102. *Potapnev MP.* Autophagia, apoptosis, cell necrosis and immune recognition of their and someone else's. *Immunology.* 2014; 2: 95–102.
22. Гоникова ЗЗ, Никольская АО, Кирсанова ЛА, Шагидулин МЮ, Онищенко НА, Севастьянов ВИ. Сравнительный анализ эффективности стимуляции процессов регенерации печени клетками костного мозга и общей РНК этих клеток. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2019; 21 (1): 113–121. *Gonikova ZZ, Nikolskaya AO, Kirsanova LA, Shagidulin MYu, Onishchenko NA, Sevastianov VI.* The comparative analysis of the effectiveness of stimulation of liver regeneration by bone marrow cells and total RNA of these cells. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs.* 2019; 21 (1): 113–121. (In Russ.) <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2019-1-113-121>.
23. 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. eLIBRARY ID: 26280345.
24. Budd RC. Death receptors couple to both cell proliferations and apoptosis. *J Clin Invest.* 2002 Feb 15; 109 (4): 437–442. doi: 10.1172/JCI15077.

*Статья поступила в редакцию 08.07.2022 г.
The article was submitted to the journal on 08.07.2022*