

Активация репаративной регенерации печени под влиянием сочетанной трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и звёздчатых клеток печени

Ирина Юрьевна Маклакова^{1,2*}, Дмитрий Юрьевич Гребнев^{1,2},
Артур Васильевич Осипенко¹

¹Уральский государственный медицинский университет, г. Екатеринбург, Россия;

²Институт медицинских клеточных технологий, г. Екатеринбург, Россия

Реферат

Цель. Изучить влияние сочетанной трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных и звёздчатых клеток печени на репаративную регенерацию печени.

Методы. Лабораторным мышам производили внутривенное введение мультипотентных мезенхимальных стромальных и звёздчатых клеток печени после проведения частичной гепатэктомии. Мышей разделили на четыре группы: контрольная, опытная 1 (введение мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток), опытная 2 (котрансплантация мультипотентных мезенхимальных стромальных и звёздчатых клеток печени), группа сравнения. Проводили сравнение показателей опытных групп с показателями контрольной группы и группы сравнения. В каждой группе было по 14 животных. Контрольной и опытным группам проводили частичную гепатэктомию. Мышам опытных групп вводили клетки в латеральную хвостовую вену через 1 ч после проведения операции. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки вводили в дозе 4 млн клеток/кг (120 тыс. клеток/мышь), звёздчатые клетки печени — в количестве 9 млн клеток/кг (270 тыс. клеток/мышь), суспендированных в 0,2 мл 0,9% раствора натрия хлорида. Животным контрольной группы вводили 0,9% раствор NaCl — 0,2 мл в латеральную хвостовую вену. Группу сравнения составили мыши без частичной гепатэктомии, которым вводили 0,9% раствор натрия хлорида — 0,2 мл. С целью оценки репаративной регенерации печени были исследованы морфометрические показатели печени, биохимические показатели крови на 3-и и 7-е сутки после частичной гепатэктомии. Производили оценку выраженности апоптоза иммуногистохимическим методом, методом проточной цитометрии определяли активность ферментов репарации дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) семейства поли(АДФ-рибоза)-полимеразы. Также осуществляли определение количества гепатоцитов с микроядрами. С помощью иммуноферментного анализа сыворотки крови изучали содержание фактора роста гепатоцитов. Достоверность различий в сравниваемых выборках определяли с применением t-критерия Стьюдента. Статистическая обработка данных выполнена с помощью программного пакета SPSS Statistics (версия 17,0).

Результаты. Установлено, что сочетанная трансплантация мультипотентных мезенхимальных стромальных и звёздчатых клеток печени вызывает восстановление активности аланинаминотрансферазы (снижение на 30,3%, $p=0,016$), аспартатаминотрансферазы (снижение на 27,7%, $p=0,021$), щелочной фосфатазы (уменьшение активности на 21,1%, $p=0,036$), усиление белковосинтетической функции печени (повышение уровня альбумина на 36,6%, $p=0,009$), увеличение уровня фактора роста гепатоцитов на 74,3%. Эти изменения сопровождались восстановлением морфометрических показателей печени: произошло увеличение митотической активности гепатоцитов на 28,7% ($p=0,008$), площади ядра гепатоцитов на 26,7% ($p=0,006$), количества двоядерных гепатоцитов на 26,1% ($p=0,004$), что привело к восстановлению массы печени. Выявлено снижение уровня апоптоза на 28,8% ($p=0,006$) относительно контрольной группы, уменьшение количества гепатоцитов с микроядрами на 22,7% ($p=0,001$), что может быть связано с обнаруженным в ходе исследования повышением активности ферментов репарации ДНК семейства поли(АДФ-рибоза)-полимеразы. Указанные отклонения отмечены относительно показателей контрольной группы (оперированные животные, которым вводили 0,9% раствор натрия хлорида).

Вывод. Сочетанная трансплантация мультипотентных мезенхимальных стромальных и звёздчатых клеток печени активирует репаративную регенерацию печени после частичной гепатэктомии.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, звёздчатые клетки печени, регенерация печени, частичная гепатэктомия.

Для цитирования: Маклакова И.Ю., Гребнев Д.Ю., Осипенко А.В. Активация репаративной регенерации печени под влиянием сочетанной трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и звёздчатых клеток печени. *Казанский мед. ж.* 2021; 102 (5): 669–677. DOI: 10.17816/KMJ2021-669.

Activation of reparative liver regeneration following the combined transplantation of multipotent mesenchymal stromal cells and hepatic stellate cells

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

¹Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russia;

²Institute of medical cell technologies, Ekaterinburg, Russia

Abstract

Aim. To study the effect of combined transplantation of multipotent mesenchymal stromal and hepatic stellate cells on the reparative liver regeneration.

Methods. Laboratory mice were given intravenous administration of multipotent mesenchymal stromal and hepatic stellate cells after partial hepatectomy. The mice were divided into four groups: control, experimental 1 (injection of multipotent mesenchymal stromal cells), experimental 2 (co-transplantation of multipotent mesenchymal stromal cells and hepatic stellate cells), the comparison group. Comparison of the experimental groups with the control group and the comparison group was carried out. Each group consisted of 14 animals. The control and experimental groups underwent partial hepatectomy. The experimental mice were injected with the cells into the lateral tail vein 1 hour after the operation. Multipotent mesenchymal stromal cells were administered at a dose of 4 million cells/kg (120 thousand cells/mouse), hepatic stellate cells — in the amount of 9 million cells/kg (270 thousand cells/mouse), suspended in 0.2 ml 0.9% NaCl solution. The control group animals were injected with 0.2 ml 0.9% NaCl solution into the lateral tail vein. The comparison group consisted of mice without partial hepatectomy, injected with 0.2 ml 0.9% NaCl solution. To assess reparative regeneration of the liver, morphometric parameters of the liver, blood biochemical parameters on the 3rd and 7th days after partial hepatectomy were studied. The severity of apoptosis was assessed by the immunohistochemical method, the activity of deoxyribonucleic acid (DNA) repair enzymes of the poly (ADP-ribose) polymerases was determined by flow cytometry. The number of micronucleated hepatocytes was also determined. The hepatocyte growth factor (HGF) content was measured by using an enzyme-linked immunosorbent assay in serum. The significance of differences in the compared samples was determined by using the Student's t-test. Statistical data processing was performed by using the SPSS Statistics software version 17.0.

Results. It was found that the combined transplantation of multipotent mesenchymal stromal and stellate liver cells causes restoration of the activity of alanine aminotransferase (a decrease of 30.3%, $p=0.016$), aspartate aminotransferase (a decrease of 27.7%, $p=0.021$), alkaline phosphatase (a decrease of 21.1%, $p=0.036$), an increase in the protein synthetic function of the liver (increase in albumin level by 36.6%, $p=0.009$), an increase in hepatocyte growth factor level by 74.3%. These changes were accompanied by the restoration of liver morphometric parameters: there was an increase in the mitotic activity of hepatocytes by 28.7% ($p=0.008$), the nuclear area of hepatocytes by 26.7% ($p=0.006$), the number of binucleated hepatocytes by 26.1% ($p=0.004$), which led to the restoration of liver mass. There was a decrease in the level of apoptosis by 28.8% ($p=0.006$) and a decrease in the number of micronucleated hepatocytes by 22.7% ($p=0.001$) compared with the control group, which may be related to an increase in the activity of Poly (ADP-ribose) polymerase repair enzymes detected in the study. The deviations were presented as a difference relative to the indicators of the control group (operated animals that were injected with 0.9% NaCl solution).

Conclusion. Combined transplantation of multipotent mesenchymal stromal and hepatic stellate cells activates reparative liver regeneration after partial hepatectomy.

Keywords: multipotent mesenchymal stromal cells, MSC, hepatic stellate cells, HSC, liver regeneration, partial hepatectomy.

For citation: Maklakova I.Yu., Grebnev D.Yu., Osipenko A.V. Activation of reparative liver regeneration following the combined transplantation of multipotent mesenchymal stromal cells and hepatic stellate cells. *Kazan Medical Journal.* 2021; 102 (5): 669–677. DOI: 10.17816/KMJ2021-669.

Актуальность. Физиологическая регенерация в печени осуществляется с низкой скоростью. В норме в печени только 0,0012–0,01% гепатоцитов вступает в митоз. При патологии печени скорость клеточного обновления в печени возрастает в тысячи раз [1].

Пролиферация клеток начинается в перипортальной области. Образующиеся гепатоциты мигрируют по печёночным трабекулам по направлению к центральным венам. После резекции происходит гипертрофия оставшейся ткани печени [2, 3].

В восстановлении массы оставшихся после операции сегментов печени принимает участие два типа клеток — гепатоциты и клетки-предшественники. В качестве одного из кандидатов на роль клеток-предшественников гепатоцитов рассматривают звёздчатые клетки печени (ЗКП; клетки печени Ито, перисинусоидальные клетки печени) [4].

ЗКП — непаренхиматозные клетки, выполняющие следующие функции: осуществляют депонирование витамина А, обеспечивают ремоделирование внеклеточного матрикса, участвуют в регуляции синусоидального микроциркуляторного русла, синтезируют факторы роста (фактор роста гепатоцитов, фактор роста эндотелия сосудов, эпидермальный фактор роста, трансформирующий фактор роста) [5]. Ряд авторов указывают на возможность дифференцировки ЗКП в гепатоциты и холангиоциты, что даёт основание считать их стволовыми клетками печени [4, 6].

Учитывая биологические свойства ЗКП, представляется перспективным их использование для активации регенерации печени после частичной гепатэктомии. Проведение аллогенной трансплантации этих клеток может сопровождаться развитием иммунологических конфликтов [7]. Этого можно избежать путём проведения сочетанной трансплантации ЗКП вместе с мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками (ММСК), которые, обладают иммуносупрессивными свойствами [8, 9]. Кроме того, доказана способность ММСК через паракринный механизм, путём формирования межклеточных контактов, через слияние с гепатоцитами активировать репаративную регенерацию печени [10, 11].

Цель настоящего исследования — изучение влияния сочетанной трансплантации ММСК и ЗКП на активацию репаративной регенерации печени после частичной гепатэктомии.

Материал и методы исследования. Эксперименты выполнены на 56 белых беспородных мышцах-самцах в возрасте 7–8 мес, с массой

тела 25–27 г. Опыты, уход и содержание животных осуществляли в соответствии с Директивой №63 от 22 сентября 2010 г. 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.

Источником ММСК служил хорион плаценты 5 лабораторных животных мышей-самок в возрасте 3–4 мес, срок гестации 18 дней. Мононуклеарную фракцию клеток получали путём 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 (Termo Scientific, США) при температуре 37 °C с содержанием углекислого газа 5% и влажности 90%. Для трансплантации лабораторным животным использовали ММСК третьего пассажа. Введение ЗКП проводили непосредственно после выделения клеток [12].

Иммунофенотипирование суспензии ММСК проводили методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител, конъюгированных с флюорохромами (Becton Dickinson, США). Во фракции трансплантируемых клеток оценивали содержание ММСК с иммунофенотипом положительных по CD105 (Rat IgG_{2A} Anti-Mouse Endoglin/CD105-Fluorescein Clone 209701, RTU), CD29 (Rat IgG_{2A} Anti-Mouse Integrin beta 1/CD29-PE Clone 265917), Sca-1 (Rat IgG_{2A} Anti-Mouse Sca-1 APC Clone 177228) и отрицательных по CD45 (Rat IgG_{2B} 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: MesenCult™ Osteogenic Stimulatory Supplement (StemCell Technologies, Канада); в адипоцитарном направлении: MesenCult™ Adipogenic Stimulatory Supplement (Stem-

Таблица 1. Распределение животных по группам

Время выведения из эксперимента	Контрольная группа	Опытная группа 1 (ММСК)	Опытная группа 2 (ММСК+ЗКП)	Группа сравнения
3-и сутки	7 мышей	7 мышей	7 мышей	7 мышей
7-е сутки	7 мышей	7 мышей	7 мышей	7 мышей

Примечание: ММСК — мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки; ЗКП — звёздчатые клетки печени.

Cell Technologies, Канада) и MesenCult™ MSC Basal Medium (Mouse) (StemCell Technologies, Канада) в соотношении 1:4, 2 ммоль раствора L-глутамина (StemCell Technologies, Канада).

Наличие остеогенной дифференцировки подтверждали гистохимическим методом по увеличению экспрессии щелочной фосфатазы (ЩФ), а также окраской по von 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 четыре группы: контрольная, опытная 1 (введение ММСК), опытная 2 (котрансплантация ММСК и ЗКП), группа сравнения (мыши без частичной гепатэктомии, которым вводили 0,9% раствор NaCl — 0,2 мл).

В каждой группе было по 14 животных. Контрольной и опытным группам проводили частичную гепатэктомию по методу C. Mitchell и H. Willenbring. Для анестезии использовали золетил 10 мг/кг (Virbac, Франция) [13]. Выведение животных из эксперимента проводили на 3-и и 7-е сутки после операции цервикальной дислокацией (табл. 1).

Мышам опытных групп вводили клетки в латеральную хвостовую вену: ММСК — в дозе 4 млн клеток/кг (120 тыс. клеток/мышь), ЗКП — в количестве 9 млн клеток/кг (270 тыс. клеток/мышь), суспендированных 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 мыши без частичной гепатэктомии, которым вводили 0,9% раствор NaCl — 0,2 мл.

На 3-и и 7-е 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 и 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) goat polyclonal IgG, 1:100; Santa Cruz Biotech, USA] и вторичных (donkey anti-goat IgG-FITC, 1:100; Santa Cruz Biotech, USA) антител на гистологических срезах по идентификации эффекторной каспазы-3. Величину запрограммированной гибели гепатоцитов определяли расчётом апоптотического индекса.

Микроядерный тест проводили после механической и ферментативной обработки [пропаза Е, коллагеназа I типа и ДНК-аза (Sigma)] клеток печени и окраски 2,5% ацетоорсеином с докрасиванием цитоплазмы клеток 1% спиртовым раствором светлого зелёного [14].

Для оценки выраженности репаративных процессов в клетках печени анализировали количество поли-АДФ-рибозаполимера, являющегося продуктом реакции поли-АДФ-рибозилирования, определяя первичные [Anti-Poly (ADP-Ribose) Polymer antibody, abcam] и вторичные [Rabbit Anti-Chicken IgY H&L (FITC)] антитела на проточном цитометре. Рассчитывали среднюю интенсивность флуоресценции популяции клеток, характеризующую экспрессию антигенов (плотность рецепторов) внутри клетки [15].

Биохимические показатели сыворотки крови [альбумин, аспартатаминотрансфераза (АСТ), аланинаминотрансфераза (АЛТ), ЩФ] определяли кинетическими методиками с использованием анализатора Chem Well 2910 (Combi) и реагентов Олвекс Диагностикум, Россия.

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

Таблица 2. Морфометрическая характеристика репаративных процессов в печени мышей на 3-и сутки после частичной гепатэктомии

Показатели	NaCl (группа сравнения)	NaCl + частичная гепатэктомия (кон- трольная группа)	ММСК + частич- ная гепатэктомия (опытная группа 1)	ММСК + ЗКП + частичная гепатэк- томия (опытная группа 2)
Масса печени, г	1,81±0,15	1,04±0,09 ¹	1,11±0,10 ¹	1,25±0,10 ^{1,2}
Апоптотический индекс, ‰	0,43±0,04	2,13±0,20 ¹	1,96±0,19 ¹	1,54±0,15 ^{1,2}
Количество гепатоцитов с микроядрами, ‰	2,21±0,18	3,37±0,26 ¹	3,07±0,23 ¹	2,97±0,20 ¹
Митотический индекс, ‰	0,74±0,06	8,1±0,60 ¹	7,91±0,58 ¹	10,03±0,75 ^{1,2}
Количество гепатоцитов, на 1 мкм ²	1525,57±101,06	1206,72±91,96 ¹	1167,86±93,55 ¹	1160,0±113,14 ¹
Площадь гепатоцита, мкм ²	267,53±6,39	331,81±24,02 ¹	343,71±22,61 ¹	333,43±18,20 ¹
Площадь цитоплазмы гепа- тоцита, мкм ²	219,14±7,12	243,64±19,25	237,63±15,94	249,14±9,84
Площадь ядра гепатоцита, мкм ²	48,40±3,57	67,13±7,01 ¹	67,89±6,9 ¹	84,29±8,61 ^{1,2}
Ядерно-цитоплазматиче- ский индекс	0,22±0,02	0,27±0,01 ¹	0,29±0,01 ¹	0,34±0,02 ^{1,2}
Количество двуядерных гепатоцитов, на 1 мм ²	234,43±9,92	380,97±10,15 ¹	386,71±21,39 ¹	484,0±35,71 ^{1,2}

Примечание: ¹p < 0,05 с группой сравнения; ²p < 0,05 с контрольной группой; ММСК — мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки; ЗКП — звёздчатые клетки печени.

Исходные данные имели нормальное распределение. Для проверки нормальности распределения был использован критерий Шапиро–Уилка. Достоверность различий в сравниваемых выборках определяли с применением t-критерия Стьюдента. Данные представлены в виде среднего арифметического значения (М) и стандартного отклонения (SD). Статистическая обработка данных проведена с помощью программного пакета SPSS Statistics (версия 17,0).

Результаты. При оценке морфометрических показателей печени на 3-и сутки после частичной гепатэктомии у животных после введения ММСК и ЗКП обнаружено увеличение массы печени на 20,2% (p=0,005) по сравнению с контрольной группой. Восстановление её массы сопровождалось повышением митотической активности гепатоцитов на 23,8% (p=0,016), снижением запрограммированной клеточной гибели на 27,7% (p=0,022), а также повышением количества двуядерных гепатоцитов на 26,8% (p=0,008), увеличением площади ядра гепатоцитов на 25,5% (p=0,011) и ядерно-цитоплазматического индекса на 24,9% (p=0,003).

На 3-и сутки после трансплантации ММСК животным с частичной гепатэктомией не выявлено изменения морфометрических показателей печени относительно контрольной группы (табл. 2).

На 7-е сутки после введения ММСК у мышей с частичной гепатэктомией установлено увеличение массы печени, которое достигалось за счёт повышения митотической активности гепатоцитов, ингибирования апоптоза, увеличения количества двуядерных гепатоцитов, повышения площади ядра.

В то же время при проведении котрансплантации ММСК и ЗКП на 7-е сутки наблюдения морфометрические показатели мышей в опытной группе сохраняют изменения, обнаруженные на 3-и сутки: снижение запрограммированной клеточной гибели гепатоцитов на 28,8% (p=0,014), увеличение количества двуядерных гепатоцитов на 26,1% (p=0,006), повышение размеров ядра на 26,7% (p=0,001), возрастание ядерно-цитоплазматического индекса на 31,0% (p=0,001). Увеличение количества двуядерных гепатоцитов можно объяснить тем, что в ранние сроки репаративной регенерации значительная часть митозов ацитокинетические.

Также на 7-е сутки после частичной гепатэктомии сохраняется увеличенная митотическая активность, способствующая восстановлению массы печени. Отмечено повышение активности ферментов репарации ДНК, что ведёт к снижению количества гепатоцитов с микроядрами в опытных группах 1 и 2 (табл. 3).

Таблица 3. Морфофункциональная характеристика репаративных процессов в печени мышей на 7-е сутки после частичной гепатэктомии

Показатели	NaCl (группа сравнения)	NaCl + частичная гепатэктомия (кон- трольная группа)	ММСК + частич- ная гепатэктомия (опытная группа 1)	ММСК + ЗКП + частичная гепатэк- томия (опытная группа 2)
Масса печени, г	1,76±0,13	1,15±0,09 ¹	1,53±0,12 ²	1,48±0,09 ²
Апоптотический индекс, %	0,39±0,03	1,25±0,09 ¹	0,94±0,07 ^{1,2}	0,89±0,08 ^{1,2}
Количество гепатоцитов с микроядрами, %	2,18±0,11	2,77±0,23 ¹	2,21±0,16 ²	2,14±0,18 ²
Митотический индекс, %	0,73±0,06	4,51±0,47 ¹	5,76±0,49 ^{1,2}	5,80±0,37 ^{1,2}
Активность ферментов семейства PARP в клетках печени, MFI	45,2±4,1	59,3±5,21 ¹	80,6±7,5 ^{1,2}	86,3±8,06 ^{1,2}
Количество гепатоцитов, на 1 мкм ²	1538,14±103,59	1427,71±116,98	1485,14±116,20	1354,0±138,0
Площадь гепатоцита, мкм ²	264,66±5,87	286,41±22,44	275,14±24,16	292,57±20,94
Площадь цитоплазмы гепа- тоцита, мкм ²	214,21±8,10	223,03±17,97	204,37±22,80	212,21±13,88
Площадь ядра гепатоцита, мкм ²	50,46±3,29	63,39±5,12 ¹	76,63±4,92 ^{1,2}	80,36±7,08 ^{1,2}
Ядерно-цитоплазматиче- ский индекс	0,24±0,02	0,29±0,02 ¹	0,38±0,02 ^{1,2}	0,38±0,02 ^{1,2}
Количество двуядерных гепатоцитов, на 1 мм ²	237,29±8,24	320,77±10,64 ¹	393,90±23,23 ^{1,2}	404,71±27,47 ^{1,2}

Примечание: ¹p < 0,05 с группой сравнения; ²p < 0,05 с контрольной группой; ММСК — мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки; ЗКП — звездчатые клетки печени; MFI — средняя интенсивность флуоресценции популяции клеток.

Таблица 4. Содержание фактора роста гепатоцитов в сыворотке крови

Сутки после опе- рации	NaCl (группа сравнения)	NaCl + частичная гепатэктомия (кон- трольная группа)	ММСК + частичная гепатэктомия (опыт- ная группа 1)	ММСК + ЗКП + ча- стичная гепатэктомия (опытная группа 2)
3-и	4,22±0,35	18,21±1,76 ¹	20,02±2,0 ¹	24,12±2,36 ^{1,2,3}
7-е	4,49±0,39	9,58±0,88 ¹	13,0±1,02 ^{1,2}	16,7±2,62 ^{1,2,3}

Примечание: ¹p < 0,05 с группой сравнения; ²p < 0,05 с контрольной группой; ³p < 0,05 с опытной группой 1; ММСК — мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки; ЗКП — звездчатые клетки печени.

Проведение частичной гепатэктомии сопровождается значительным повышением уровня фактора роста гепатоцитов в сыворотке крови на 3-и сутки после операции. Введение ММСК не приводит к достоверному изменению ($p=0,723$) этого показателя относительно группы контроля, тогда как проведение котрансплантации ММСК и ЗКП вызывает ещё большее увеличение уровня фактора роста гепатоцитов (на 32% по сравнению с данными контрольной группы; $p=0,001$).

На 7-е сутки после частичной гепатэктомии также отмечен эффект от введенных клеток. Содержание фактора роста гепатоцитов в опытной группе 1 было на 35% ($p=0,002$), в опытной группе 2 — на 57% выше по сравнению с контрольной группой ($p=0,001$; табл. 4).

При анализе биохимических показателей крови на 3-и сутки в опытной группе 1 снижается активность ферментов, характеризующих цитолиз гепатоцитов (АСТ, АЛТ). В группе мышей, которым вводили ММСК и ЗКП, выявлено уменьшение активности ферментов цитолиза гепатоцитов и холестаза (ЩФ) с одновременным повышением концентрации мочевины (табл. 5).

На 7-е сутки после частичной гепатэктомии в опытной группе 2 повышается содержание общего белка, альбумина, при этом уровень общего белка и альбумина достигает значений группы сравнения. Также зарегистрированы повышение содержания мочевины, снижение уровня ферментов цитолиза (АСТ, АЛТ) и холестаза (ЩФ), уровень ферментов аналогичен группе сравнения. Также выявле-

Таблица 5. Биохимические показатели крови мышей на 3-и сутки после частичной гепатэктомии

Показатели	NaCl (группа сравнения)	NaCl + частичная гепатэктомия (контрольная группа)	ММСК + частичная гепатэктомия (опытная группа 1)	ММСК + ЗКП + частичная гепатэктомия (опытная группа 2)
Общий белок, г/л	68,31±3,93	50,03±4,82 ¹	55,61±4,24 ¹	53,67±4,34 ¹
Альбумин, г/л	30,84±4,25	19,80±2,51 ¹	21,60±3,14 ¹	22,01±2,04 ¹
Мочевина, ммоль/л	6,21±0,87	4,37±0,33 ¹	4,59±0,36 ¹	5,26±0,29 ^{1,2}
Аспаратаминотрансфераза, ед./л	97,26±8,47	209,53±13,85 ¹	158,99±14,38 ^{1,2}	156,97±13,35 ^{1,2}
Аланинаминотрансфераза, ед./л	81,13±8,66	155,24±9,38 ¹	116,73±12,51 ^{1,2}	114,16±13,53 ^{1,2}
Щелочная фосфатаза, ед./л	66,34±5,24	106,67±10,45 ¹	82,0±7,26 ²	83,47±8,40 ^{1,2}
Глюкоза, ммоль/л	5,73±0,69	3,66±0,29 ¹	4,20±0,46 ¹	3,87±0,32 ¹
Общий билирубин, мкмоль/л	8,90±1,14	21,99±5,47 ¹	21,29±2,36 ¹	20,13±1,61 ¹
Фибриноген, г/л	3,27±0,18	2,27±0,26 ¹	2,11±0,18 ¹	2,67±0,22 ¹

Примечание: ¹p < 0,05 с подгруппой сравнения; ²p < 0,05 с контрольной группой; ММСК — мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки; ЗКП — звёздчатые клетки печени.

Таблица 6. Биохимические показатели крови мышей на 7-е сутки после частичной гепатэктомии

Показатели	NaCl (группа сравнения)	NaCl + частичная гепатэктомия (кон- трольная группа)	ММСК + частич- ная гепатэктомия (опытная группа 1)	ММСК + ЗКП + частичная гепатэк- томия (опытная группа 2)
Общий белок, г/л	66,46±4,36	44,27±3,62 ¹	49,63±2,80 ¹	60,27±5,09 ^{2,3}
Альбумин, г/л	31,41±3,38	20,59±1,90 ¹	23,13±2,32 ¹	28,06±2,16 ²
Мочевина, ммоль/л	6,11±0,61	4,57±0,46 ¹	5,57±0,48 ²	5,63±0,35 ²
Аспаратаминотрансфераза, ед./л	104,56±9,07	153,86±16,96 ¹	103,57±12,42 ²	111,21±10,01 ²
Аланинаминотрансфераза, ед./л	89,23±4,43	137,10±16,29 ¹	86,34±7,52 ²	95,50±8,57 ²
Щелочная фосфатаза, ед./л	63,30±4,00	83,11±5,93 ¹	64,23±6,00 ²	65,61±4,36 ²
Глюкоза, ммоль/л	6,44±0,62	4,30±0,29 ¹	4,91±0,51 ¹	5,20±0,34 ^{1,2}
Общий билирубин, мкмоль/л	9,37±0,65	15,41±2,76 ¹	14,81±2,02 ¹	13,70±0,83 ¹
Фибриноген, г/л	3,20±0,23	2,20±0,23 ¹	2,83±0,20 ²	2,87±0,24 ²

Примечание: ¹p < 0,05 с подгруппой сравнения; ²p < 0,05 с контрольной группой; ³p < 0,05 с опытной группой 1; ММСК — мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки; ЗКП — звёздчатые клетки печени.

но повышение уровня глюкозы и фибриногена. Введение ММСК не сопровождалось восстановлением белковосинтетической функции печени (табл. 6). Кроме того, выявлено повышение содержания общего белка в опытной группе 2 относительно опытной группы 1 (см. табл. 6).

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

Обсуждение. В настоящей работе было изучено влияние ММСК и 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. Установлено, что сочетанная трансплантация ММСК и ЗКП обеспечивает повышение массы печени уже на 3-и сутки, а на 7-е сутки она восстанавливается до

значений группы сравнения за счёт повышения митотической активности гепатоцитов и снижения запрограммированной клеточной гибели.

В литературе 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 эти клетки оказывают влияние путём выработки биологически активных веществ, а также путём дифференцировки в гепатоциты [4].

Полученный в настоящем исследовании положительный эффект от проведённой сочетанной трансплантации клеток можно объяснить способностью ЗКП вырабатывать фактор роста гепатоцитов, который служит мощным митогеном для гепатоцитов, способствуя активации клеточной и внутриклеточной регенерации. Выявленное изменение биохимических показателей крови [нормализация содержания ферментов цитолиза (АСТ, АЛТ) и холестаза (ЩФ)] можно объяснить способностью ММСК к выработке противовоспалительных факторов [16, 17].

Проведённые 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

1. Аллогенная сочетанная трансплантация мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из хориона плаценты, и звёздчатых клеток печени способствует активации регенерации печени. Этот эффект проявляется в активации механизмов клеточной регенерации за счёт повышения митотической активности гепатоцитов и ингибирования запрограммированной клеточной гибели.

2. Проведение котрансплантации данных видов клеток сопровождается уменьшением количества патологических митозов, увеличением количества двуядерных гепатоцитов.

3. Проведённые исследования свидетельствуют о способности сочетанной трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных и звёздчатых клеток печени обе-

спечивать восстановление морфофункционального состояния печени после частичной гепатэктомии и дают основание для проведения пилотных клинических исследований.

Участие авторов. И.Ю.М. проводила исследование; Д.Ю.Г. отвечал за сбор и анализ результатов; А.В.О. — руководитель работы.

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке государственного задания «Разработка технологии использования сочетанной трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и звёздчатых клеток печени для активации регенерации печени в условиях её повреждения», номер регистрации 121032500021-1 от 25.03.2021.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ельчанинов А.В., Макаров А.В., Воробьёва И.Г., Кананыхина Е.Ю., Лохонина А.В., Глинкина В.В., Большакова Г.Б., Гольдштейн Д.В., Фатхудинов Т.Х. Регуляция пролиферации гепатоцитов после субтотальной резекции печени крыс. *Гены и клетки*. 2018; 13 (4): 37–42. [Elchaninov A.V., Makarov A.V., Vorobieva I.G., Kananykhina E.Yu., Lokhonina A.V., Glinkina V.V., Bolshakova G.B., Goldshtein D.V., Fatkhudinov T.H. Regulation of hepatocyte proliferation after subtotal liver resection in rats. *Geny i kletki*. 2018; 13 (4): 37–42. (In Russ.)] DOI: 10.23868/201812045.
2. Базарный В.В., Маклакова И.Ю., Гребнев Д.Ю., Юсупова В.Ч., Петрунина Е.М. К вопросу о клеточной регуляции регенерации печени. *Вестн. Уральской мед. акад. науки*. 2019; 16 (3): 357–364. [Bazarniy V.V., Maklakova I.Yu., Grebnev D.Yu., Yusupova V.Ch., Petrulina E.M. About cellular regulation of liver regeneration. *Vestnik Uralskoy meditsinskoy akademicheskoy nauki*. 2019; 16 (3): 357–364. (In Russ.)] DOI: 10.22138/2500-0918-2019-16-3-357-364.
3. Brown Ch., McKee Ch., Bakshi Sh., Walker K., Hakman E., Halassy S., Svinarich D., Dodds R., Govind Ch.K., Chaudhry G.R. Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential. *J. Tissue Engineering and Regenerative Med*. 2019; 13 (9): 1738–1755. DOI: 10.1002/term.2914.
4. Kordes C., Sawitza I., Gotze S., Haussinger H.D. Hepatic stellate cells contribute to progenitor cells and liver regeneration. *J. Clin. Invest*. 2014; 124 (12): 5503–5515. DOI: 10.1172/JCI74119.
5. Yin C., Evason K.J., Asahina K., Stainier D.Y. Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer. *J. Clin. Invest*. 2013; 123 (5): 1902–1910. DOI: 10.1172/JCI66369.
6. Alwahsh S.M., Rashidi H., Hay D.C. Liver cell therapy: is this the end of the beginning? *Cell. Mol. Life Sci*. 2018; 75 (8): 1307–1324. DOI: 10.1007/s00018-017-2713-8.
7. Benbow H.J., Marrero E.M., McGee R.M., Brandon-Warner E., Attal N., Feilen N.A., Culbertson C.R. Hepatic stellate cell-derived exosomes modulate macrophage inflammatory response. *Experim. Cell Res*. 2021; 405 (1): 112663. DOI: 10.1016/j.yexcr.2021.112663.
8. Hu C., Li L. Preconditioning influences mesenchy-

mal stem cell properties in vitro and in vivo. *J. Cell. Mol. Med.* 2018; 22 (3): 1428–1442. DOI: 10.1111/jcmm.13492.

9. Kobolak J., Dinnyes A., Memic A., Khademhosseini A., Mobasheri A. Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. *Methods in Cell Sci.* 2016; 99: 62–68. DOI: 10.1016/j.ymeth.2015.09.016.

10. Alfaif M., Eom Y.W., Newsome P.N., Baik S.K. Mesenchymal stromal cell therapy for liver diseases. *J. Hepatol.* 2018; 68: 1272–1285. DOI: 10.1016/j.jhep.2018.01.030.

11. Prockop D.J. The exciting prospects of new therapies with mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* 2017; 19 (1): 1–8. DOI: 10.1016/j.jcyt.2016.09.008.

12. Mederacke I., Dapito D.H., Affò S., Uchinami H., Schwabe R.F. High-yield and high-purity isolation of hepatic stellate cells from normal and fibrotic mouse livers. *Nature Protocols.* 2015; 10 (2): 305–315. DOI: 10.1038/nprot.2015.017.

13. Mitchell C., Willenbring H. A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice. *Nature Protocols.* 2008; 3: 1167–1171. DOI: 10.1038/nprot.2014.122.

14. Баглей Е.А., Недопитанская Н.Н., Лисовская В.С. Изучение генотоксичности ципроконазола в микроядерном тесте на гепатоцитах и эритроцитах костного мозга мышей. *Украинский ж. соврем. пробл. токсикол.* 2014; (1–2): 51–58. [Bagley E.A., Nedopitanska N.N., Lisovska V.S. Genotoxicity study of cyproconazole in the bone marrow erythrocyte and hepatocytes micronucleus assay in mice. *Ukrainskiy zhurnal sovremennykh problem toksikologii.* 2014; (1–2): 51–58. (In Russ.)]

15. Kunzmann A., Lui D., Annett K., Malaise M., Thaa B., Hyland P., Barnett Y., Burkle A. Flow-cytometric assessment of cellular poly(ADP-ribosylation) capacity in peripheral blood lymphocytes. *Immunity & Ageing.* 2006; 3: 8. DOI: 10.1186/1742-4933-3-8.

16. Вахрушева В.Ч., Маклакова И.Ю., Гребнев Д.Ю., Базарный В.В., Гаврилов И.В. Оценка морфофункциональных изменений печени после её резекции на фоне введения мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в условиях старения организма. *Вестн. уральской мед. акад. науки.* 2020; 17 (1): 89–97. [Vahrusheva V.Ch., Maklakova I.Yu., Grebnev D.Yu., Bazarnyi V.V., Gavrilov I.V. Assessment of morphofunctional changes of the liver after its resection on the background of introduction of multipotent mesenchymal stromal cells in aging conditions. *Vestnik uralskoy meditsinskoy akademicheskoy nauki.* 2020; 17 (1): 89–97. (In Russ.)] DOI: 10.22138/2500-0918-2020-17-1-89-97.

17. Маклакова И.Ю., Гребнев Д.Ю., Юсупова В.Ч., Гаврилов И.В., Примакова Е.А. Влияние трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток на биохимические показатели крови после резекции печени у зрелых и старых лабораторных животных. *Успехи геронтол.* 2018; 31 (6): 933–936. [Maklakova I.Yu., Grebnev D.Yu., Yusupova V.Ch., Gavrilov I.V., Primakova E.A. The impact of transplantation of multipotent mesenchymal stromal cells after liver resection on blood biochemical parameters in mature and old laboratory animals. *Uspekhi gerontologii.* 2018; 31 (6): 933–936. (In Russ.)]