

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «УРАЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

МАКЛАКОВА ИРИНА ЮРЬЕВНА

**ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ КОРРЕКЦИИ СТВОЛОВЫМИ
КЛЕТКАМИ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ПЕЧЕНИ
ПРИ ЕЕ ПОВРЕЖДЕНИИ И СТАРЕНИИ**

14.03.03 – патологическая физиология

Диссертация на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Научный консультант:
доктор медицинских наук, профессор
В.В. Базарный

Екатеринбург
2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	7
Глава 1. Использование клеточных технологий для восстановления морфофункционального состояния печени (обзор Литературы)	18
1.1. Клеточные технологии в регенеративной медицине	18
1.2. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки и их свойства	19
1.3. Фенотип мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток.....	21
1.4. Дифференцировочный потенциал мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток	22
1.5. Трофическая функция мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток	23
1.6. Иммуномодулирующие свойства мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток	25
1.7. Плацента как источник стволовых клеток.....	32
1.8. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки в регенерации печени.....	33
1.9. Характеристика гемопоэтических стволовых клеток.....	34
1.10. Гемопоэтические стволовые клетки в регенерации печени	37
1.11. Перисинусоидальные клетки печени	39
1.12. Роль активированных перисинусоидальных клеток печени	44
1.13. Методы выделения перисинусоидальных клеток печени	46
1.14. Особенности регенерации печени при старении	50
ГЛАВА 2. МЕТОДИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	55
2.1. Дизайн исследования	55
2.2. Выделение, культивирование, идентификация ММСК.....	59

2.3. Выделение гемопоэтических стволовых клеток из хориона плаценты	65
2.4. Выделение и идентификация перисинусоидальных клеток печени	69
2.5. Экспериментальные модели повреждения печени	75
2.6. Лабораторные методы исследования	77
2.6.1. Определение основных морфометрических показателей печени	78
2.6.2. Определение интенсивности апоптоза	80
2.6.3. Микроядерный тест	83
2.6.4. Определение активности Поли(ADF-рибоза) полимеразы (PARP)	85
2.7. Определение уровня фактора роста гепатоцитов (HGF) в сыворотке крови	87
2.8. Оценка предтрансплантационной безопасности ММСК, ГСК и ПКП	88
2.9. Исследование хоуминга клеток	93
2.10. Получение клеточного лизата	95
2.11. Методы статистической обработки	95
ГЛАВА 3. Изменение морфофункционального состояния печени животных разного возраста под Влиянием мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в физиологических условиях и при повреждении печени	96
3.1. Изучение хоуминга трансплантированных клеток в физиологических условиях и в условиях повреждения печени	96
3.2. Морфофункциональная характеристика печени зрелых и старых лабораторных мышей	104
3.3. Влияние ММСК на показатели морфофункционального состояния печени без её повреждения у животных разного возраста	115
3.4. Изучение влияния ММСК на морфофункциональное состояние печени животных разного возраста после частичной гепатэктомии	119

3.4.1. Морфометрические показатели печени животных разного возраста с частичной гепатэктомией после введения мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток.....	120
3.4.2. Биохимические показатели крови животных разного возраста с частичной гепатэктомией после введения мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток.....	123
3.5. Изучение влияния ММСК на морфофункциональное состояние печени мышей разного возраста при ее токсическом повреждении путем введения четыреххлористого углерода	126
3.5.1. Морфометрические показатели печени животных разного возраста после введения ММСК на фоне токсического повреждения печени.....	126
3.5.2. Биохимические показатели крови животных разного возраста с токсическим повреждением печени после трансплантации ММСК.....	131
Заключение по 3 главе	134
ГЛАВА 4. Влияние сочетанного введения мультипотентных мезенхимальных стромальных и гемопоэтических стволовых клеток на морфофункциональное состояние печени мышей разного возраста в физиологических условиях и при повреждении печени	142
4.1. Влияние котрансплантации ММСК и ГСК на морфофункциональное состояние печени животных разного возраста в физиологических условиях..	142
4.2. Влияние котрансплантации ММСК и ГСК на морфофункциональное состояние печени животных разного возраста после частичной гепатэктомии	146
4.2.1. Морфометрические показатели печени животных разного возраста с частичной гепатэктомией после сочетанного введения ММСК и ГСК	146
4.2.2. Биохимические показатели крови животных разного возраста после частичной гепатэктомии на фоне котрансплантации ММСК и ГСК	149

4.3. Изучение влияния котрансплантации ММСК и ГСК на морфофункциональное состояние печени животных разного возраста при токсическом повреждении печени	152
4.3.1. Морфологическое исследование печени после котрансплантации ММСК и ГСК животным разного возраста после токсического повреждения печени	152
4.3.2. Биохимические показатели крови животных разного возраста после котрансплантации ММСК и ГСК на фоне токсического повреждения печени	158
Заключение к главе 4	160
ГЛАВА 5. Влияние котрансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных и перисинусоидальных клеток печени на морфофункциональное состояние печени животных разного возраста в физиологических условиях и при повреждении печени	
5.1. Влияние котрансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных и перисинусоидальных клеток печени на морфофункциональное состояние печени животных разного возраста в физиологических условиях.	165
5.2. Изучение влияния котрансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных и перисинусоидальных клеток печени на морфофункциональное состояние печени животных разного возраста после частичной гепатэктомии	170
5.2.1. Морфометрические показатели печени животных разного возраста после частичной гепатэктомии на фоне сочетанного введения ММСК и ПКП	170
5.2.2. Биохимические показатели крови животных разного возраста после сочетанной трансплантации ММСК и ПКП на фоне частичной гепатэктомии	174
5.3. Изучение влияния котрансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных и перисинусоидальных клеток печени на морфофункциональное состояние печени животных разного возраста при токсическом повреждении печени	178
5.3.1. Морфометрические показатели печени животных разного возраста после котрансплантации ММСК и ПКП при токсическом повреждении печени	178

5.3.2. Биохимические показатели крови животных разного возраста после котрансплантации ММСК и ПКП при токсическом повреждении печени	184
5.4. Оценка морфофункционального состояния печени животных после введения лизата клеток	186
Заключение к главе 5	188
Общее заключение	192
Выводы	210
УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....	212
Список литературы	215

ВВЕДЕНИЕ

Изучению механизмов регенерации печени в физиологических условиях и в условиях острой печеночной недостаточности посвящено значительное количество работ [85, 98, 104, 105, 153, 162, 221]. Однако при этом роль клеточной регуляции в патогенезе восстановления морфофункционального состояния печени в условиях ее повреждения остается в значительной степени не изученной [25, 126, 164, 198, 202, 215, 248]. В то же время в последние годы недостаточная эффективность используемых терапевтических подходов при повреждении печени обусловила развитие нового направления, связанного с применением клеточных технологий [130, 201, 227, 257, 285]. Обсуждается терапевтический потенциал различных видов стволовых клеток и в настоящее время в центре внимания исследований находятся несколько популяций клеток, демонстрирующих способность трансформироваться в гепатоциты [138, 170, 204, 249, 294].

Однако с точки зрения терапии наиболее подходящая клеточная популяция все еще не определена. Несмотря на то, что использование стволовых клеток может быть привлекательной альтернативой трансплантации печени, необходимы дальнейшие исследования для изучения их потенциала в качестве источника репопуляционных клеток печени. В последние годы накапливается экспериментальный материал, свидетельствующий о способности мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) вырабатывать противовоспалительные факторы, факторы роста, обеспечивающие повышение пролиферативной активности гепатоцитов [59, 72, 111, 139, 203, 267].

Доказана способность гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) посредством слияния с гепатоцитами (fusion-affect) активировать репаративную регенерацию печени [15, 236]. В ремоделировании внеклеточного матрикса печени особая роль отводится перисинусоидальным клеткам печени (ПКП). Эти клетки вырабатывают различные митогены для гепатоцитов, синтезируют коллагены IV, VI и XIV типов, гликопротеины, протеогликаны, матриксные металлопротеиназы [30, 62, 70, 122, 182, 193]. В последние годы получены сведения о способности перисинусоидальных клеток печени дифференцироваться в гепатоциты, холангиоциты [38, 46, 197, 278, 315].

Способность к самоподдержанию этих клеток позволила ряду авторов рассматривать перисинусоидальные клетки печени как претендента на роль стволовой клетки печени [30, 70, 132, 179, 183]. Имеются данные о выработке ММСК хемоаттрактанта для ГСК и ПКП [146, 190, 206, 230, 247]. Способность ММСК оказывать иммуносупрессивное действие позволяет проводить аллогенную сочетанную трансплантацию ММСК с другими клетками [75, 118, 136, 167, 192]. Учитывая биологические особенности взаимодействия ММСК с ГСК, а также с ПКП представляется перспективным изучение влияния комбинаций этих клеток на морфофункциональное состояние печени в условиях её повреждения, а также при старении. Проводя клеточную терапию, необходимо учитывать состояние реципиента. Важным в этом отношении является возраст пациента.

Известно, что при старении организма снижается способность клеток к направленному движению, к дифференцировке, выработке биологически активных веществ, снижается чувствительность клеток к факторам роста [10, 37, 76, 117, 189]. Это определяет отличия в развитии физиологической и репаративной регенерации при старении.

Цель исследования. Обоснование эффективности применения мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток и их комбинации с гемопоэтическими стволовыми клетками и перисинусоидальными клетками печени для коррекции восстановительных процессов в печени при её повреждении у зрелых и старых животных в эксперименте.

Задачи исследования

1. Выявить влияние ММСК, сочетанной трансплантации ММСК и ГСК, а также котрансплантации ММСК и ПКП на морфофункциональное состояние печени зрелых и старых лабораторных животных в физиологических условиях.

2. Оценить влияние ММСК, котрансплантации ММСК и ГСК, сочетанной трансплантации ММСК и ПКП на морфофункциональное состояние печени после частичной гепатэктомии.

3. Определить особенности влияния ММСК, сочетанной трансплантации ММСК и ГСК, котрансплантации ММСК и ПКП на морфофункциональное состояние печени при ее повреждении четыреххлористым углеродом.

4. Установить оптимальную комбинацию клеток для восстановления морфофункционального состояния печени в условиях ее повреждения, вызванного частичной гепатэктомией и введением четыреххлористого углерода в зависимости от возраста.

5. Оценить эффективность воздействия ММСК, сочетанной трансплантации ММСК и ГСК, а также котрансплантации ММСК и ПКП на репаративную регенерацию печени с учетом возрастных особенностей.

Научная новизна

На основании проведенного исследования впервые сформулирована концепция использования мультипотентных мезенхимальных стромальных,

сочетанной трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных и гемопоэтических стволовых клеток, а также котрансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных и перисинусоидальных клеток печени для восстановления морфофункционального состояния печени в условиях ее повреждения. Показано, что изучаемые комбинации клеток способны активировать репаративную регенерацию печени, не оказывая влияния на физиологическую регенерацию.

Установлено, что после частичной гепатэктомии оптимальной комбинацией клеток для восстановления морфофункционального состояния печени зрелого и старого организма является сочетанная трансплантация ММСК и ПКП. В условиях токсического повреждения печени наиболее эффективной комбинацией клеток является сочетанная трансплантация ММСК и ГСК.

Впервые выявлено, что введение ММСК зрелым и старым лабораторным животным приводит к повышению активности репарации ДНК в клетках печени, следствием чего является снижение запрограммированной гибели гепатоцитов и уменьшение количества гепатоцитов с микроядрами.

Полученные данные о влиянии ММСК, сочетанной трансплантации ММСК и ГСК, котрансплантации ММСК и ПКП на восстановление морфофункционального состояния печени при ее повреждении свидетельствуют о различном механизме восстановления печени в зависимости от возраста, а также от вида повреждения.

Показаны разные механизмы восстановления структуры и функции печени у зрелых и старых лабораторных животных. У зрелых животных введение клеток при повреждении печени приводит к активации митотической активности и ингибированию запрограммированной гибели гепатоцитов, в то время как у старых - к снижению апоптоза.

Новизна исследований подтверждена получением патентами Российской Федерации :

1. Пат.2391400 Российская Федерация, МПК С 12 N 5/0735, С 12 N 7/48. Способ снятия клеток с культуральной поверхности при проведении пассажа мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток / И.Ю. Маклакова, Д. Ю. Гребнев, А. П. Ястребов ; заявитель и патентообладатель Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Уральская государственная медицинская академия» Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию (ГОУ ВПО УГМА РОСЗДРАВА). - № 2008141199/13 ; заявл. 16.10.2008 ; опубл. 10.06.2010 // Изобретения. Полезные модели. – 2010. Бюл. № 16 (III ч.). – С. 755.

2. Пат. 2481396 Российская Федерация, МПК С 12 N 5/00, G 01 N 33/49, А 61 К 35/12. Способ выделения гемопоэтических стволовых клеток методом иммуномагнитной сепарации / А. П. Ястребов, Д. Ю. Гребнев, И. Ю. Маклакова; заявитель и патентообладатель Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Уральская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации» (ГБОУ ВПО УГМА Минздравсоцразвития России). – № 2011137686/10; заявл. 13.09.2011; опубл. 10.05.2013 // Изобретения. Полезные модели. – 2013. – Бюл. № 13 (I ч.). – С. 239.

3. Пат. 2474610 Российская Федерация, МПК С 12 N 5/07, А 61 К 35/16. Способ выделения гемопоэтических стволовых клеток / Д. Ю. Гребнев, А. П. Ястребов, И. Ю. Маклакова, С. Л. Леонтьев, С. В. Сазонов; заявитель и патентообладатель Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Свердловской области «Центр организации специализированных видов медицинской помощи «Институт медицинских клеточных технологий» (ГБУЗСО Институт медицинских клеточных технологий) - №2012109054/10;

заявл. 11.03.2012; опубл. 10.02.2013 // Изобретения. Полезные модели. – 2013. – Бюл. № 4 (II ч.). – С. 248.

4. Пром. образец 87338 Российская Федерация, МКПО 19-07. Схема активации регенерации тканей с помощью стволовых клеток / А. П. Ястребов, Д. Ю. Гребнев, С. В. Сазонов, И. Ю. Маклакова, С. Л. Леонтьев; заявитель и патентообладатель Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Свердловской области «Центр организации специализированных видов медицинской помощи «Институт медицинских клеточных технологий» (ГБУЗСО Институт медицинских клеточных технологий) - № 2012503883; заявл. 08.11.2012; опубл. 16.12.2013 // Промышленные образцы. – 2013. – Бюл. № 12 (II ч.). – С. 409.

5. Пром. образец 92457 Российская Федерация, МКПО 19-07. Схема иммуномодулирующего влияния ММСК / Д. Ю. Гребнев, А. П. Ястребов, И. Ю. Маклакова, С. Л. Леонтьев, С. В. Сазонов; заявитель и патентообладатель Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Свердловской области «Центр организации специализированных видов медицинской помощи «Институт медицинских клеточных технологий» (ГБУЗСО Институт медицинских клеточных технологий). - № 2014501246; заявл. 19.03.2015; опубл. 16.04.2015 // Промышленные образцы. – 2015.

6. Пром. образец 98129 Российская Федерация, МКПО 19-07. Схема влияния ММСК на активацию регенерации печени в условиях ее токсического повреждения / И. Ю. Маклакова, Д. Ю. Гребнев, А. П. Ястребов, С. Л. Леонтьев, С. В. Сазонов; заявитель и патентообладатель Государственное автономное учреждение здравоохранения Свердловской области «Центр организации специализированных видов медицинской помощи «Институт медицинских клеточных технологий» (ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»). - № 2015502967; заявл. 21.08.2015; опубл. 16.05.2016 // Промышленные образцы. – 2015.

7. Пат.2739855 Российская Федерация, МПК G09B 23/28 A61K 35/50 A61P 1/16. Способ восстановления биохимических показателей периферической крови лабораторных животных с токсическим гепатитом / И. Ю. Маклакова, Д. Ю. Гребнев, В. Ч. Вахрушева, И. В. Гаврилов; заявитель и патентообладатель Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Свердловской области «Центр организации специализированных видов медицинской помощи «Институт медицинских клеточных технологий» (ГБУЗСО Институт медицинских клеточных технологий) – № 2020100837; заявл. 09.01.2020; опубл. 29.12.2020 // Изобретения. Полезные модели. – 2021.

Теоретическая и практическая значимость работы

Впервые разработана и обоснована концепция использования аллогенной трансплантации разных видов стволовых клеток: мультипотентных мезенхимальных стромальных, сочетанной трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных и гемопоэтических стволовых клеток, котрансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных и перисинусоидальных клеток в условиях повреждения печени.

Установлено восстановление морфофункционального состояния печени после трансплантации изучаемых комбинаций клеток в условиях повреждения печени, как у зрелых, так и у старых лабораторных животных. Выявлено, что ММСК, сочетанная трансплантация ММСК и ГСК, котрансплантация ММСК и ПКП активируют репаративную регенерацию печени и не влияют на ее физиологическую регенерацию. Доказано, что механизмы восстановления структуры печени у зрелых и старых лабораторных животных при введении мультипотентных мезенхимальных стромальных, сочетанной трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных и гемопоэтических стволовых клеток, котрансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных и перисинусоидальных клеток печени разные. Выявлены

особенности регенерации печени в зависимости от вида повреждения. Разработана схема влияния сочетанной трансплантации разных видов клеток на восстановление морфофункционального состояния печени зрелых и старых животных в условиях ее повреждения.

Результаты проведенного исследования внедрены в практику научной работы Федерального бюджетного учреждения науки «Екатеринбургский медицинский научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (директор – д.м.н. М.П. Сутункова), лаборатории антивозрастных технологий Государственного автономного учреждения здравоохранения Свердловской области «Центр специализированных видов медицинской помощи «Институт медицинских клеточных технологий» (главный врач д.м.н., профессор С.Л. Леонтьев).

Результаты диссертационной работы используются в учебном процессе кафедр патологической физиологии и гистологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России (ректор – д.м.н., член-корр. РАН, профессор Ковтун О.П.), кафедры патологической физиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России (ректор – заслуженный деятель науки РФ, д.м.н., профессор Волчегорский И.А.), кафедры медицинской биохимии и биофизики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Уральского федерального университета имени первого Президента России Б. Н. Ельцина (ректор – канд. истор. наук, доцент Кокшаров В.А.)

Апробация работы

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на III Национальном конгрессе по регенеративной медицине (15-18 ноября 2017 г. г. Москва), VI Межрегиональной научно-практической конференции «Клеточные технологии – практическому здравоохранению» (г. Екатеринбург 7 декабря 2017 г.), Всероссийской конференции с международным участием StemCellBio – 2018. Фундаментальная наука как основа трансляционной медицины (г. Санкт-Петербург 15-17 ноября 2018 г.), IV Национальном конгрессе по регенеративной медицине (г. Москва 22-23 ноября 2019 г.), Международной научно-практической конференции: «Современная наука: тенденции развития» (Кишинев, Молдавия, 2019 г.), Международной научно-практической конференции: «Актуальные исследования XXI» (Душанбе, Таджикистан, 2019 г.), Международной научно-практической конференции «Современная наука: актуальные вопросы, достижения и инновации» (Минск, Беларусь, 27 сентября 2019 г.), Международном молодежном форуме «Неделя науки - 2019» (г. Ставрополь, 2019 г.), VIII Международной научно-практической конференции «Клеточные технологии – практическому здравоохранению» (г. Екатеринбург, 3-4 декабря), IV Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых, аспирантов, студентов «Актуальные проблемы медико-биологических дисциплин» (Саранск, 2019 г.), IX Межрегиональной научно-практической конференции «Клеточные технологии – практическому здравоохранению» (г. Екатеринбург, 2020 г).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 35 работ, из них в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ - 20, в том

числе в журналах Scopus - 10. По теме диссертации получено 4 патента на изобретение и 3 патента на промышленный образец.

Положения, выносимые на защиту

1. При частичной гепатэктомии для восстановления морфофункционального состояния печени у зрелых и старых животных наиболее эффективной является сочетанная трансплантация ММСК и ПКП.

2. При остром токсическом повреждении печени для восстановления морфофункционального состояния печени у зрелых и старых животных оптимальной является котрансплантация ММСК и ГСК.

3. Трансплантация ММСК, сочетанная трансплантация ММСК и ГСК, а также котрансплантация ММСК и ПКП зрелым и старым животным при повреждении печени приводит к снижению активности ферментов цитолиза и холестаза.

4. Трансплантация ММСК, сочетанная трансплантация ММСК и ГСК, а также ММСК и ПКП зрелым и старым животным при повреждении печени способствует активации репаративных процессов в печени, ингибированию запрограммированной клеточной гибели гепатоцитов.

5. Механизмы восстановления морфофункционального состояния печени при введении ММСК, проведении сочетанной трансплантации ММСК и ГСК, а также ММСК и ПКП у зрелых и старых животных отличаются. У зрелых животных происходит активация митотической активности и угнетение апоптоза, у старых - снижение запрограммированной гибели гепатоцитов.

Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 257 страницах и состоит из введения, 5 глав, общего заключения, выводов, списка литературы. Диссертация

иллюстрирована 83 таблицами, 52 рисунками. Список литературы включает 319 источников, из них 202 зарубежных и 117 отечественных.

ГЛАВА 1. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ПЕЧЕНИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Клеточные технологии в регенеративной медицине

Регенеративная медицина - это быстро развивающаяся область медицины, направленная на восстановление, поддержание и улучшение функций организма [1, 36, 112, 172, 231, 267]. Клеточные технологии могут обеспечить лечение тех состояний, где существующие методы терапии неэффективны. Целью клеточной терапии является предоставление безопасных и эффективных методов лечения.

В начале 1900 - х годов исследователи поняли, что различные типы кровяных телец - белые кровяные тельца, красные кровяные тельца и тромбоциты - все произошли от определенной «стволовой клетки». Проводили исследование, в котором облученным мышам вводили клетки костного мозга. При этом обнаружили, что количество колоний, которое появилось в селезенке, было пропорционально введенным клеткам костного мозга. В результате исследования было получено, что из каждой клетки костного мозга появляется колония [172, 231, 243, 304]. Дальнейшие исследования показали способность этих клеток к неограниченному самовосстановлению, что является основной характеристикой стволовых клеток. Кроме способности к самообновлению стволовые клетки обладают свойством дифференцироваться в различных направлениях. При правильных условиях или при наличии правильных сигналов стволовые клетки могут давать (дифференцироваться) множество различных типов клеток, составляющих организм. Важную роль играет микроокружение стволовых клеток или их «ниша». Ниша включает в себя сигнальные молекулы,

межклеточные коммуникации и взаимодействия между стволовыми клетками и внеклеточным матриксом. Микроокружение влияет на свойства, которые определяют «стволовость» стволовых клеток, то есть самообновление, способность к дифференцировке [142, 212, 245, 270]. Интересная теория заключается в том, что стволовые клетки могут быть клетками, способными дифференцироваться в различные типы клеток в зависимости от ниши хозяина. Взрослые стволовые клетки, которые имплантируются в совершенно другую нишу (другой зародышевой слой), потенциально могут дифференцироваться в типы клеток, аналогичные тем, которые встречаются в новой среде [210, 229, 269]. Потенциал стволовых клеток и их пластичность обладают неоценимыми свойствами для регенеративной медицины. Одной из главных целей клеточных технологий является поиск стволовых клеток, которые легко получить и которые безопасны и эффективны при трансплантации.

1.2. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки и их свойства

Источником мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) могут быть различные ткани: пуповинная кровь, костный мозг, плацента и жировую ткань [13, 63, 82, 140, 158, 280, 302]. В литературе описаны и другие названия для популяций ММСК: мезенхимальные стромальные клетки, мезенхимальные прогениторные клетки, мультипотентные стромальные клетки, мезенхимальные клетки-предшественники [16, 141, 203, 288]. ММСК являются клетками, которые могут дифференцироваться в разные виды специализированных клеток, включая остеобласты, хондроциты и адипоциты [45, 95, 107, 120, 268]. Относительная легкость выделения ММСК, комбинированная с их

способностью к самообновлению и мультипотентность делает их применение перспективным для лечения различных заболеваний.

Впервые мультипотентные стромальные популяции клеток-предшественников были выделены из костного мозга и описаны как нефагоцитарные, фибробластоподобные по внешнему виду и способные образовывать адгезивные колонии. В дальнейшем они были названы «колониеобразующими единицами-фибробластами» (кое-Ф) [101, 203]. Другие исследования показали, что ММСК, полученные из костного мозга, представляют собой клетки-предшественники мезенхимальных тканей. В некоторых исследованиях сообщалось о превращении мультипотентных стволовых клеток в клетки другой линии путем трансдифференцировки, хотя существуют различные мнения по этому феномену [139, 206, 230]. Хотя ММСК первоначально были идентифицированы в костном мозге, в дальнейшем они были получены и из других источников, таких как периферическая кровь, легкие, жировая ткань, синовиальные жидкости, периодонтальные связки и мышцы. Кроме того, ММСК получают также из плаценты, пуповины и пуповинной крови, а также пульпы зубов [47, 51, 150, 180, 277]. Примечательно, что ММСК, полученные из различных источников, различаются по своим биологическим характеристикам. Существуют различия в профилях поверхностно-активных веществ, дифференцировке, а также паракринных функциях, что может определять различное клиническое применение ММСК [61, 66, 135, 188].

ММСК из аллогенных источников чаще используются в исследованиях, чем аутологичные ММСК, хотя оба источника клеток продемонстрировали сопоставимые клинические эффекты. Обычно называемые «универсальными донорскими клетками», благодаря свойству иммунной толерантности эти клетки обладают рядом клинических преимуществ [97, 106, 128, 143, 300]. Ключевые характеристики, которые определяют принадлежность к ММСК,

основаны на их способности к образованию колоний, потенциале самообновления, экспрессии поверхностных маркеров и последующей способности к многолинейной дифференцировке.

Колонии ММСК проявляют гетерогенные морфологические характеристики, варьирующие от фибробластоидных до веретенообразных или от больших уплощенных до маленьких круглых клеток. При проведении пассажей клетки обычно высевают по 100-150 клеток на 10-сантиметровую чашку Петри и дают им прикрепиться и образовать колонии в течение 14 дней [131, 140, 174, 193, 303].

1.3. Фенотип мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток

Популяции ММСК имеют естественную вариабельность экспрессии маркеров клеточной поверхности. ММСК могут проявлять фенотипическую изменчивость во времени («пластичность»). Кроме того, ни один из маркеров ММСК не является окончательно специфичным (т.е. абсолютно необходимым и достаточным для установления идентичности ММСК). Тем не менее, установлено, что культивируемые колонии ММСК экспрессируют CD73, CD 90, CD 105, но при этом отсутствует экспрессия на CD 14, CD 34, CD 45, CD 19, HLA-DR [135, 139, 266, 288].

Первоначальные исследования выявили такие маркеры, как SH2 и SH3, которые соответствуют CD105 и CD73 соответственно. Эти маркеры вместе с CD 90 были рассмотрены Международным обществом клеточной терапии (ICST) в качестве первичных маркеров, экспрессируемых на более чем 95% ММСК в данной культуре [141, 175]. Однако следует отметить, что экспрессия CD105, CD90 и CD73 не может быть абсолютно специфичной для недифференцированных мультипотентных ММСК, поскольку некоторые из этих маркеров также экспрессируются гладкомышечными клетками и зрелыми стромальными клетками, такими как фибробласты. Также маркером ММСК

является экспрессия CD49a (интегрин A1; ITGA1), PDGFR-A/Б (рецепторы А и В тромбоцитарного фактора роста), EGFR - epidermal growth factor receptor (рецептора эпидермального фактора роста), рецептора инсулин подобного фактора роста (IGFR - insulin-like growth factor receptor), и STRO-3 [140, 154, 267, 280, 302]. В последующем были выделены антитела против коллагена VI (COL6A1), CD44 и HLA-DR, которые оказались полезными для идентификации субпопуляций в культурах ММСК [139, 146, 149, 203, 271]. Изучение ММСК мышей дало новую информацию, подчеркивающую сходство в экспрессии некоторых поверхностных маркеров, включая CD140a и CD295 (рецептор лептина), между мышинными и человеческими ММСК [107, 135, 190, 295]. Однако, при экстраполяции информации, полученной от других видов, необходимо учитывать видоспецифическую неоднородность фенотипа ММСК.

1.4. Дифференцировочный потенциал мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток

Несмотря на то, что поверхностные маркеры можно довольно просто оценить, при идентификации ММСК необходимо проанализировать способность их дифференцироваться в классических направлениях: остеогенном, адипоцитарном, хондрогенном. При культивировании в специальных дифференцировочных средах в течение нескольких недель клетки начинают сливаться и часть из них способна спонтанно минерализоваться, что указывает на способность ММСК к дифференцировке в костную линию. Такие факторы, как аскорбиновая кислота и дексаметазон, при определенных концентрациях способны направлять ММСК в сторону остеогенной дифференцировки [95, 120, 268, 305]. Для стимуляции адипогенеза к культурам обычно добавляют индометацин. Аскорбат, трансферрин, селеновая кислота и TGF- β являются хорошо

зарекомендовавшими себя индукторами хондрогенеза [95]. Широко известно, что протоколы дифференциации, которым следуют лаборатории во всем мире, не обязательно совпадают. Такие факторы, как антибиотики и ростовые добавки, такие как сыворотка крови, могут влиять на фенотипические свойства ММСК и их дифференцировочный потенциал [120, 268, 309]. При культивировании в определенных условиях со специфическими индуцирующими факторами ММСК могут дифференцироваться в нейронные, миоцитарные и эпителиальные клетки, тем самым демонстрируя их эндодермический и нейроэктодермический потенциал дифференцировки. В ряде исследований, использующих модели трансдифференцировки *in vivo*, сообщалось, что ММСК дифференцируются, приводя к функциональному улучшению эндогенных тканей через механизмы слияния клеток [286, 313].

Существуют различия в дифференцировочном потенциале ММСК разных пассажей. После длительного культивирования ММСК демонстрируют ограниченный потенциал к дифференцировке. Только часть колоний ММСК после длительного культивирования может дифференцироваться во все три линии [187, 281, 301, 303]. Большинство ММСК после значительного количества пассажей становятся би-мощными и способны дифференцироваться только в остеогенном и хондрогенном направлениях. Поэтому в исследованиях используют ММСК не более чем 3-5 пассажа [131, 134, 240, 274].

1.5. Трофическая функция мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток

Трофическая функция ММСК относится к их функциональной способности генерировать репаративную среду через межклеточные контакты, сопровождается паракриной секрецией биологически активных макромолекул, способствующих иммуномодуляции воспалительных клеток

(например, Т-клеток, макрофагов и тучных клеток). Трофические факторы включают в себя факторы роста, морфогены, хемокины, цитокины, внеклеточные везикулы (например, экзосомы) и гликозаминогликаны [24, 83, 91, 155, 222, 258].

Иммуномодулирующие свойства ММСК способствуют подавлению местных иммунных реакций, одновременно модулируя ангиогенез, апоптоз и пролиферацию клеток [41, 186, 192, 214]. Эти свойства в совокупности создают микроокружение, которое позволяет поврежденным тканям устанавливать саморегулирующийся регенеративный ответ [44, 142, 212]. Исторически сложилось так, что ММСК первоначально привлекали внимание из-за их «стволовой» природы и потенциального использования в качестве терапевтических агентов путем замещения клеток в поврежденных тканях. Однако во многих экспериментальных условиях трансплантированные клетки восстанавливают тканевые функции без какого-либо обнаруживаемого приживания в ткани хозяина или дифференцировки. Трофическая функция ММСК проявляется в их способности поддерживать ГСК, подавлять местную иммунную систему секрецией цитокинов, способствовать нейротрофическому и функциональному восстановлению после инсульта и восстанавливать работу сердца [63, 83, 124, 139]. Предполагается, что ММСК способствуют восстановлению тканей путем межклеточного контакта и/или секреции биологически активных факторов. Некоторые опубликованные результаты подтверждают предположение о том, что приживание клеток в месте дефекта не является обязательным для восстановления тканей [100, 190, 203]. Показано, что при незавершенном остеогенезе (болезнь Лобштейна-Фролика) у младенцев при трансплантации аллогенных клеток костного мозга происходит увеличение минеральной плотности костной ткани и уменьшение переломов костей, хотя было обнаружено, что менее 2% донорских ММСК были привиты [230, 235]. Другие исследования показали, что лишь немногие

введенные ММСК выживают через 6 недель после имплантации у крыс с дефектом бедренной кости. При этом наблюдаемая регенерация костной ткани обусловлена всплеском трофических факторов, секретлируемых трансплантированными ММСК [90, 247]. Аналогичным образом, трансплантация ММСК в других моделях заболеваний привела к улучшению сердечной функции, нейрогенеза, а также модуляции иммунной системы при заболевании трансплантат против хозяина [219, 275, 307, 316]. Эти результаты в целом согласуются с распространенной в настоящее время идеей о том, что ММСК способствуют восстановлению тканей не только за счет приживления, но и за счет доставки биологически активных факторов.

1.6. Иммуномодулирующие свойства мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток

ММСК оказывают значительное воздействие на иммунный ответ путем взаимодействия с компонентами как адаптивного, так и врожденного иммунитета. Они влияют на межклеточные взаимодействия и на экспрессию клетками иммунной системы различных факторов. Благодаря этим свойствам, ММСК могут предотвращать излишнюю активацию Т-лимфоцитов и формировать иммунологическую толерантность на время собственного приживления, тем самым внося большой вклад в поддержание иммунного гомеостаза [75, 118].

Взаимодействие ММСК и Т-лимфоцитов

Вопрос взаимодействия ММСК и Т-лимфоцитов представляет наибольший интерес, так как Т-лимфоцитам принадлежит очень важная роль в модуляции иммунного ответа. После активации лимфоцитов происходит их пролиферация и дифференцировка на различные субпопуляции, выполняющие специфичные функции. ММСК оказывают влияние на пролиферацию и дифференцировку Т-лимфоцитов, таким образом, модулируя Т-клеточное

звено иммунного ответа [97, 128, 317]. При активации Т-лимфоциты начинают экспрессировать CD 69, CD 25, CD 38; HLA-DR, цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген-4 (CTLA-4), а также цитокины: γ -интерферон, фактор некроза опухолей и интерлейкин-2. В настоящее время в литературе встречаются разные мнения, относящиеся к влиянию ММСК на активацию Т-лимфоцитов. В ряде работ продемонстрировано, что ММСК, препятствуют экспрессии ранних маркеров активации CD69, CD25 в Т-клетках, стимулированных фитогемагглютинином [136, 159, 167]. Есть работы, авторы которых не отмечают эффект ММСК на изменение экспрессии этих молекул [143, 173]. Получение столь разных данных может быть связано с использованием различных популяций Т-лимфоцитов. Таким образом, активация мононуклеаров крови фитогемагглютинином в присутствии ММСК привела к снижению количества CD4⁺ и CD8⁺ клеток, которые экспрессировали CD25, CD38 и CD69. При использовании аналогичной модели другими авторами также было продемонстрировано снижение количества клеток, экспрессирующих CD3⁺CD25⁺ и CD3⁺CD38⁺. Тем не менее, в работе, использующей популяцию CD3⁺ Т-лимфоцитов, в присутствии ММСК активированных комплексом анти-CD2/CD3/CD28, получено повышение экспрессии CD69 в CD8⁺ и CD4⁺ популяциях Т-лимфоцитов [186, 214].

Имеются также противоречивые данные, о влиянии ММСК на секрецию цитокинов активированными Т-клетками. В ряде работ продемонстрировано, что секреция γ -интерферона активированными Т-лимфоцитами в присутствии ММСК может и возрастать, и снижаться [192, 219, 223]. Возможно, что влияние ММСК на секрецию интерферона зависит от источника, из которого была выделена культура лимфоцитов. Так, активация CD3⁺ Т-лимфоцитов, выделенных из жировой ткани, анти-CD2/CD3/CD28 комплексом в присутствии ММСК, сопровождалась усилением секреции IFN γ , тогда как в

культуре мононуклеаров крови, [253], активированных аналогичным способом, такого эффекта не наблюдалось [275, 307].

Эффекты ММСК на пролиферацию Т-лимфоцитов не зависят от способа активации. При кокультивировании облученных ММСК и аллоактивированных лимфоцитов было выявлено, что ММСК ингибируют пролиферацию Т-клеток в зависимости от дозы. Также, кроме угнетения пролиферации, вызванной аллоантигенами, ММСК могут подавлять пролиферацию, вызванную неспецифическими митогенами, такими, как фитогемагглютинин или анти- CD3/CD28 комплекс [75, 260, 300]. При добавлении ММСК в популяции РВМС и популяции, обогащенные CD3⁺, CD4⁺, и CD8⁺ лимфоцитами наблюдался одинаковый супрессивный эффект ММСК на пролиферацию Т-клеток. Иммунорегуляция на этом этапе осуществляется посредством механизмов, как зависящих, так и не зависящих от межклеточного контакта. Среди секретируемых ММСК факторов выделяют гепатоцитарный фактор роста (HGF), трансформирующий фактор роста бета-1 (TGF β ₁), простагландин E2 (PGE2), индоламин-2,3-диоксигеназу (IDO), и HLA-G5 [97, 272, 307]. В настоящее время вопрос о необходимости прямого межклеточного взаимодействия между ММСК и Т-лимфоцитами для ингибирования пролиферации последних остается спорным [118, 311, 318].

После активации при условии наличия патогена в организме или признаков повреждения, Т-хелперы CD4⁺ (Th0) дифференцируются, в зависимости от микроокружения, в один из следующих подтипов: Т-хелперы 1 типа (Th1), Т-хелперы 2 типа (Th2), Т-хелперы 17 (Th17), и регуляторные Т-лимфоциты (Treg). При этом каждый из этих подтипов секретирует различные цитокины, которые участвуют в удалении патогена из организма, уменьшении выраженности воспаления, поддержании гомеостаза. ММСК оказывают влияние на функции, дифференцировку, а также соотношение популяций Т-лимфоцитов, модулируют формирование противовоспалительного ответа [6,

128, 167]. Также ММСК ингибируют продукцию провоспалительных цитокинов IL-17, IL-22, IFN γ и TNF α и дифференцировку наивных CD4 + лимфоцитов в Т-хелперы 17. Кроме того, в присутствии ММСК увеличивается секреция IL-10 и экспрессия фактора транскрипции Foxp3, что способствует дифференцировке активированных Т-клеток в регуляторные Т-лимфоциты (Tregs), которые обладают потенциальной супрессорной активностью [7, 136, 186].

Дендритные клетки являются основными антигенпрезентирующими клетками (АПК). Основной функцией АПК являются процессирование и презентация антигена Т-лимфоцитам. Также АПК могут взаимодействовать и с другими клетками иммунной системы, такими, как В-лимфоциты и НК-клетки. Инициировать иммунный ответ могут только зрелые антигенпрезентирующие клетки. Во время созревания этих клеток происходит увеличение на их мембране экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости МНС-II и костимулирующих молекул CD86, CD80. Незрелые АПК не способны активировать Т-лимфоциты, и, помимо этого, способны вызывать толерантность [143, 192].

ММСК могут влиять на рекрутинг (постоянное обновление пула иммунокомпетентных клеток), созревание и функционирование АПК. ММСК значительно сокращают образование АПК из моноцитов посредством секреции растворимых факторов - IDO, PGE 2 и IL-10. Угнетение дифференцировки моноцитов в АПК является обратимым процессом. При активации липополисахаридом (ЛПС) незрелых АПК, выделенных из кокультур ММСК и моноцитов, наблюдалось снижение в АПК экспрессии маркера созревания CD83 и костимулирующих молекул CD80 и CD86. Эти результаты подтверждают, что ММСК могут поддерживать сохранение АПК в незрелом состоянии и оказывают сильное угнетающее действие на дифференцировку моноцитов в дендритные клетки [8, 167, 214, 175].

ММСК также способны оказывать влияние на секрецию некоторых цитокинов, которые необходимы для созревания дендритных клеток. ММСК ингибируют секрецию дендритными клетками, активированными ЛПС, TNF α . Угнетение секреции дендритными клетками TNF α приводит к ингибированию созревания дендритных клеток, а также их миграции в лимфатические узлы и способности стимулировать аллореактивные Т-лимфоциты из-за изменения в экспрессии рецепторов, необходимых для захвата и процессирования антигенов. Также ММСК ингибируют секрецию дендритными клетками IL-12. Недостаточная продукция IL-12 приводила к анергии Т-лимфоцитов и формированию толерантности [186, 192, 219].

Провоспалительные цитокины, например, IFN γ , секретируемые активированными НК-клетками и Т-лимфоцитами поддерживают ММСК-опосредованную иммунорегуляцию и могут увеличивать или снижать секрецию иммуносупрессивных молекул [75]. IDO, PGE2, TGF β 1 участвуют в взаимодействии ММСК и НК-клеток. IDO, PGE2 и IL-10 влияют на уменьшение дифференцировки моноцитов в АПК и могут предотвращать созревание дендритных клеток, что приводит к формированию анергии Т-лимфоцитов. Также ММСК индуцируют дифференцировку CD34+ гемопоэтических стволовых клеток в популяции регуляторных дендритных клеток, которые, в свою очередь, стимулируют экспрессию Foxp3+ регуляторными Т-лимфоцитами [118, 163, 275].

ММСК способны снижать секрецию γ -интерферона стимулированными ИЛ-2 НК-клетками. При этом важным является соотношение ММСК и лимфоцитов. Так если соотношение ММСК/лимфоциты было 1/1, то отмечалось снижение цитотоксической функции НК-клеток, но если соотношение менялось на 1/10, то эти эффекты исчезали. Из этого следует, что ММСК только в высоких дозах способны снижать экспансию CD 8+

популяции Т-лимфоцитов НК-клеток. При этом есть ограничение по использованию таких высоких доз ММСК в организме [97, 139, 252].

Получены данные о способности ММСК угнетать стимуляцию стимуляцию В-клеток через такие растворимые факторы как анти-CD40, анти-ИЛ-4. При этом пролиферация В-клеток блокировалась в фазе G0/G1 клеточного цикла. Добавление ММСК к активированной культуре В-клеток в соотношении 1/1 приводило к уменьшению IgM, IgG и IgA и к снижению количества Ig-продуцирующих клеток. Если соотношение ММСК/В-клетки уменьшалось, эти эффекты исчезали [118, 140, 264].

ММСК оказывают супрессивное воздействие на иммунный ответ также благодаря выработке растворимых факторов: трансформирующего ростового фактора $\beta 1$ (TGFB1) и фактора роста гепатоцитов (HGF). TGFB1 и HGF были первыми цитокинами, выявленными в ММСК-опосредованной иммунорегуляции аллоантиген-активированных Т-лимфоцитов. Оба цитокина могут, независимо друг от друга, уменьшать пролиферацию аллоантиген-активированных Т-лимфоцитов. TGFB1 и HGF экспрессируются ММСК постоянно, и, по-видимому, действуют синергетически. TGFB1 участвует в ММСК-опосредованной пролиферации CD4+CD25+Foxp3+ клеток – регуляторных Т-лимфоцитов, а также подавляет пролиферацию НК-клеток. Таким образом, трансформирующий фактор роста и фактор роста гепатоцитов реализуют ММСК-опосредованное подавление пролиферации Т-клеток в культуре лимфоцитов [128, 146].

ММСК осуществляет свое влияние на иммунный ответ также через синтез индоламин-2,3-диоксигеназы – фермента, катализирующего превращение аминокислоты триптофана в кинуренин. Недостаточное количество триптофана или накопление кинуренина приводит к ингибированию пролиферации Т-лимфоцитов. В присутствии ММСК добавление триптофана приводит к восстановлению аллоантиген-

активированной пролиферации Т-лимфоцитов [167, 203].

При добавлении кинуренина в культуру лимфоцитов происходит ингибирование пролиферации Т-лимфоцитов. Применение конкурентных ингибиторов индоламин-2,3-диоксигеназы уменьшает иммуносупрессивное действие ММСК на аллоген-активированные CD4⁺ Т-лимфоциты. Кроме того, индоламин-2,3-диоксигеназа участвует в угнетении пролиферации и цитотоксической активности НК-клеток, активированных ИЛ-2 в присутствии ММСК, а также в ингибировании созревания и функциональной активности дендритных клеток [186, 300].

Простагландин E₂ (PGE₂) также имеет важное значение в ММСК-опосредованной иммунорегуляции. PGE₂ – это медиатор липидной природы, который под влиянием ферментов ЦОГ (циклооксигеназы) образуется из арахидоновой кислоты. Эти ферменты постоянно экспрессируются ММСК, их экспрессия значительно повышается в воспалительной среде. PGE₂ стимулирует секрецию ИЛ-4 и ИЛ-10, а также стимулирует дифференцировку CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ и IL-10+IFN γ +CD4⁺ регуляторных Т-лимфоцитов. PGE₂ участвует в уменьшении дифференцировки моноцитов в дендритные клетки, а также в снижении пролиферации и цитотоксической активности НК-клеток [143, 214].

ММСК-опосредованная иммуномодуляция реализуется также через IL-10, который угнетает экспрессию цитокинов Т-хелперами 1 типа и повышает экспрессию и секрецию HLA-G5. Также IL-10 участвует в уменьшении созревания и функции дендритных клеток, ингибируя ими продукцию IL-12 [219, 280].

HLA-G (человеческий лейкоцитарный антиген G) представляет собой белок, который у человека кодируется геном HLA-G. HLA-G относится к неклассическим классам HLA класса тяжелой цепи и характеризуется

ограниченным аллельным полиморфизмом. HLA-G существует в виде мембранных изоформ (HLA-G1, G2, G3 и G4) и растворимых изоформ (HLA-G5, G6 и G7). ММСК экспрессируют мембранную изоформу HLA-G1 и растворимую изоформу HLA-G5. Экспрессии обеих молекул способствует IL-10. Также HLA-G5 стимулирует секрецию IL-10 по принципу положительной обратной связи [29, 97, 136].

Галектины - это семейство белков, способные специфически связываться с β -галактозидом. Большая часть галектинов распределены в лимфоидных и нелимфоидных тканях. Они принимают участие в регуляции клеточного гомеостаза как в системе адаптивного, так и врожденного иммунитета в качестве иммунодепрессантов или иммуностимуляторов. ММСК экспрессируют галектин-3, который участвует в регуляции процессов пролиферации, адгезии и миграции Т-лимфоцитов [128, 307].

1.7. Плацента как источник стволовых клеток

Костный мозг обычно является наиболее распространенным источником ММСК для экспериментальных и клинических исследований; однако низкое количество клеток и инвазивная процедура, связанная с получением ММСК костного мозга, делают их использование проблематичным. В последнее время такие гестационные ткани, как плацента, пуповина и околоплодные воды, были признаны потенциальными клеточными источниками для регенеративной медицины [129, 147, 151]. Было показано, что плацентарные ткани являются богатым источником стволовых клеток с сильными иммуносупрессивными свойствами, и эти ткани демонстрируют высокий потенциал для использования в клеточной терапии [187, 195, 208]. Плацента – это уникальный орган, который облегчает обмен питательными веществами и газами между кровью плода и матери. Он считается «внеэмбриональным», поскольку развивается вне развивающегося плода во время беременности и в

конечном итоге становится неработоспособным, когда плод рождается и начинает дышать самостоятельно [217, 224, 276].

Количество ММСК в костном мозге взрослого человека ниже по сравнению с плацентой [228, 287], и это число значительно уменьшается с возрастом [76]. Поэтому поиск альтернативных источников ММСК для будущих терапевтических применений является настоятельной необходимостью. Считается, что ММСК имеют мезодермальное происхождение, а плацента происходит из гомологичной экстраэмбриональной мезодермы [262, 299]. Таким образом, плацента может рассматриваться как перспективный источник ММСК.

1.8. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки в регенерации печени

В современной литературе ММСК рассматриваются как перспективное средство для лечения острой патологии печени [123, 160, 171, 185]. Потенциал дифференцировки ММСК человека *in vitro* и функциональная способность полученных из них гепатоцитов были протестированы с помощью функциональных тестов *in vitro*, демонстрирующих характеристики гепатоцитов, включая такие показатели как накопление гликогена, секрета альбумина, синтез мочевины, активность фенобарбитал-индуцируемого цитохрома P450, поглощение липопротеинов низкой плотности [154, 168]. Кроме того, функциональность была продемонстрирована *in vivo* путем успешного приживления в печени с последующей экспрессией HepPar1 (Anti-Hepatocyte Specific Antigen) и альбумина [184, 237]. Важно отметить, что ММСК способствуют восстановлению печени после ее повреждения *in vivo*.

Многие авторы считают, что усиление регенерации печени под влиянием ММСК происходит преимущественно паракринным путем, поскольку их трансплантация в печень вызывает повышение концентрации

HGF и ряда других факторов роста в регенерирующих тканях [246, 179, 312]. Терапевтическая активность ММСК, по-видимому, связана с их противовоспалительными свойствами, которые также представляют собой своего рода паракринную регуляцию, проявляющуюся локальным повышением продукции IL-4, IL-13 и TSG-6 параллельно с относительным дефицитом TNF α и IL-6. Влияние ММСК на снижение воспалительной реакции может реализовываться через действие на иммунные клетки паракринными факторами [128, 250, 254, 290].

ММСК легко дифференцируются в клетки мезодермы, такие как адипоциты, хондроциты и остеобласты, *in vitro*. Кроме того, ряд исследований подтверждает, что культивированные клетки ММСК могут дифференцироваться в гепатоциты (при комбинированном лечении гепатоцитарным фактором роста (HGF)) и клетки печеночного эпителия. Также было продемонстрировано, что ММСК могут способствовать пролиферации гепатоцитов и регенерации тканей путем секреции трофических молекул [11, 127, 169, 291].

Есть данные, что ММСК снижают провоспалительную и фиброгенную цитокиновую активность, стимулируют гепатоцеллюлярную пролиферацию, способствуют деградации коллагена матриксными металлопротеиназами и уменьшают апоптоз гепатоцитов [31, 295, 123, 168, 185]. Хемокины и цитокины, секретируемые ММСК, могут быть эффективны в снижении воспаления и апоптоза гепатоцитов как при острых, так и при хронических повреждениях печени [154, 171, 220].

1.9. Характеристика гемопоэтических стволовых клеток

Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) - это примитивные мультипотентные клетки, которые могут развиваться во все типы клеток крови, включая миелоидные и лимфоидные клетки. ГСК можно обнаружить в

различных тканях, таких как периферическая кровь, костный мозг и пуповинная кровь [62, 172]. Все клетки крови происходят из популяции мультипотентных ГСК путем их размножения и дифференцировки. От ГСК до зрелых клеток существует несколько промежуточных клеток-предшественников. Ткань костного мозга относится к тканям с высоким регенеративным потенциалом. Приблизительно, один триллион клеток появляется ежедневно в костном мозге человека [69, 194, 231].

Популяцию ГСК можно разделить на долгосрочные гемопоэтические стволовые клетки (LT-HSC - long term), кратковременные ГСК (ST-HSC - short term HSC) и мультипотентные прогениторы (MPP) с точки зрения продолжительности репопуляции. В физиологических условиях такие популяции ГСК, как LT-HSC, могут развиваться во все клетки крови в костном мозге. ГСК в крови являются ST-HSC, которые могут непосредственно способствовать восстановлению поврежденных тканей, и они рассматриваются как оптимальные источники клеток для регенеративной медицины. ГСК являются источником для клеток лимфоидного и миелоидного ростков кроветворения [77, 209, 243].

Подобно стволовым клеткам, клетки-предшественники на каждом этапе могут также быть использованы в качестве источника клеток для регенеративной медицины [137, 256, 283]. Введение клеток костного мозга человека пациентам, получающим химиотерапию и прошедшим курсы облучения, приводило к восстановлению количества лейкоцитов и повышению уровня гемоглобина [25, 194]. Тилл и Маккулох (1961 г.) провели анализ колониобразующей единицы (КОЕ), который может количественно определять ГСК/клетки-предшественники. Они разрабатывали методики экспансии ГСК *in vivo*. ГСК *in vitro* обладают способностью к дифференцировке не только в гемопоэтические клетки, но и в клетки мезенхимального происхождения, такие как гепатоциты, холангиоциты,

клетки скелетных мышц, нейроны, эпителиальные клетки кишечника, желудочно-кишечного тракта и кожи [172]. Это открывает широкие перспективы для использования их для восстановления тканей. Изучение свойств ГСК перспективно для расширения областей использования этих клеток в клинике.

Старение имеет отношение к снижению функции ГСК, а также к повышенному риску развития гематологических злокачественных новообразований. Аномальный клональный гемопоэз, который часто встречается у ГСК пожилых людей, обусловлен мутацией РНК в специфических локусах и укорочением теломер. Кроме того, при старении в ГСК повышается количество активных форм кислорода, нарушается метаболизм митохондрий и аутофагия, что является также доказательством старения ГСК [62, 209].

Эпигенетическое перепрограммирование как часть внутренней регуляции является одним из основных факторов старения ГСК. Хотя эпигенетическая аномалия легко обнаруживается, корреляция между возрастными изменениями ГСК и эпигенетической абберацией не поддается расшифровке из-за медленной потери нормального потенциала стволовых клеток. Эпигенетическая регуляция с помощью TET2, DNMT3A и EZH2 приводила к гематологической злокачественной трансформации, подразумевая верную роль эпигенетического контроля в старении ГСК. Эпигенетическая точность в нормальной нише стволовых клеток имеет важную роль для поддержания нормальных ГСК, поскольку старение ГСК обусловлено сильным вкладом возрастной ниши [194, 256].

Старение ГСК зависит от клеточных изменений, таких как эпигенетические факторы, повреждение теломер и генома, а также молекулярное повреждение, включая повреждение ДНК, и в конечном итоге приводит к дисфункциональным ГСК. Старение приводит к уменьшению

количества лимфоцитов, а также к накоплению и клональному расширению Т-клеток памяти. Между тем, миелоидные клетки, по-видимому, увеличиваются или сохраняются на одном и том же уровне в зависимости от возраста, что приводит к провоспалительной среде [86]. С возрастом у ГСК снижаются способности к самонаведению и дифференцировке по сравнению с молодыми ГСК [251].

1.10. Гемопозитические стволовые клетки в регенерации печени

ГСК способны давать не только кроветворные клетки, но и другие линии клеток путем дифференцировки и трансдифференцировки. Многие исследования показали, что ГСК могут трансдифференцироваться в клетки других линий, такие как эндотелиальные клетки, кардиомиоциты, нервные клетки и гепатоциты [62, 112]. Эти результаты, по-видимому, противоречат общим предположениям о происхождении клеток из трех зародышевых слоев и ставят под сомнение, являются ли ГСК мультипотентными клетками, которые могут трансдифференцироваться, или же они являются более примитивными функциональными клетками. Однако с середины 2000-х годов в области регенеративной медицины появляются опровержения пластичности ГСК. Исследования показывают, что ГСК через паракринные эффекты, рекрутирование клеток и модуляция микроокружения, могут восстанавливать поврежденные органы [194, 172]. Хотя прямая трансдифференцировка ГСК в регенеративные органы постоянно обсуждается и, по-видимому, не происходит *in vivo*, ГСК/клетки-предшественники все же считаются важными элементами в репарации повреждений [209, 231].

Регенерация печени в основном осуществляется за счет пролиферации гепатоцитов, которая регулируется различными факторами и цитокинами, такими как фактор роста гепатоцитов, эпидермальный фактор роста и интерлейкин-6. Также в печени найдены печеночные клетки-предшественники

[26, 28, 42, 96]. При разрушении зрелых гепатоцитов печеночные стволовые/прогениторные клетки активно пролиферируют и дифференцируются в гепатоциты. Это явление встречается как у мышей, так и у людей [93]. Клинически трансплантация печени является единственным доступным методом лечения терминальной печеночной недостаточности. Однако самым большим препятствием является нахождение подходящего HLA-совместимого донора. Поэтому были предприняты значительные усилия по разработке альтернативных методов для улучшения регенерации печени. В литературе имеются данные о том, что стволовые/прогениторные клетки, полученные из костного мозга, могут дифференцироваться в гепатоциты, что приводит к увеличению их количества [58, 125, 265]. Хотя клетки печени происходят из энтодермы, а клетки крови - из мезодермы, концепция трансдифференцировки появляется в области регенерации печени. В печени зрелых мышей содержатся C-kit⁺Scal⁺Lin⁻ клетки, которые определяются как ГСК, и эти клетки могут образовывать кроветворные колонии *in vivo* и *in vitro*, что показывает тесную связь между кроветворными клетками и гепатоцитами [60, 265]. Кроме того, ГСК способны дифференцироваться в клетки других линий, включая клетки кожи, кишечника и печени. Как уже упоминалось ранее, все внепеченочные стволовые/прогениторные клетки вносят свой вклад в морфофункциональное состояние печени. Однако, низкая эффективность (менее 0,01%) внепеченочного вклада стволовых/прогениторных клеток после трансплантации ГСК является предметом обсуждения. Большинство ученых считают, что ГСК/клетки-предшественники, сливаются с гепатоцитами хозяина, а не трансдифференцируются, что требует подтверждения цитогенетическим анализом [15, 145, 236]. Несмотря на описанные разные уровни вклада в регенерацию печени, ГСК могут быть подходящим инструментом для лечения

некоторых заболеваний печени, с помощью опосредованного слиянием аддитивного переноса генов.

Многие клинические исследования предполагают применение ГСК и трансплантации гепатоцитов [177, 256, 283]. Ожидается, что ГСК будут способствовать регенерации печени с помощью трансдифференцировки клеток, паракринных эффектов, антифибротических и проангиогенных эффектов. До сих пор не было никаких неожиданных серьезных побочных эффектов. Однако потенциально повышенный риск развития заболеваний печени, связанных с терапией ГСК, требует длительного мониторинга в клинических испытаниях. Хотя механизмы действия ГСК остаются неясными, появляются работы, свидетельствующие о положительных результатах их применения в регенеративной медицине [25, 114, 178, 226].

1.11. Перисинусоидальные клетки печени

Клетки, расположенные в перисинусоидальных пространствах Диссе называют по-разному: перисинусоидальные клетки, перициты, липоциты, интерстициальные клетки, жировые клетки, клетки, хранящие витамин А, или клетки Ито [30, 46, 62, 70]. Впервые они были описаны и названы «Sternzellen» в 1876 году Купфером с использованием метода пропитки хлоридом золота. Позднее Тошио Ито и Бронфенмайер наблюдали перисинусоидальные клетки, содержащие липидные капли в печени человека [196]. Уэйк определил, что «Sternzellen» - это те же клетки, что и витамин А накапливающие клетки печени. В 1995 году международное сообщество исследователей рекомендовало называть эти клетки звездчатыми клетками печени [181]. Однако, в международной номенклатуре по цитологии и гистологии человека эти клетки обозначены как перисинусоидальные клетки по месту их нахождения в перисинусоидальных пространствах Диссе [296].

ПКП являются печеночными непаренхиматозными клетками, расположенными в пространстве Диссе между синусоидальными эндотелиальными клетками и гепатоцитами, и составляют 5% - 8% клеток в печени [132, 315]. ПКП экспрессируют маркер стволовых клеток CD133 и проявляют свойства стволовых клеток. Происхождение ПКП до сих пор остается предметом споров. ПКП экспрессируют как мезенхимальные клеточные маркеры, такие как десмин, коллаген I типа и виментин, так и нейрональные или глиальные клеточные маркеры, такие как молекула адгезии нервных клеток (NCAM), синаптофизин, глиальный фибриллярный кислый белок (Glial fibrillary acidic protein - GFAP), нестин и p75Ntr [122, 182]. Тот факт, что ПКП экспрессируют эти маркеры, наводит на мысль, что нейронный гребень является источником ПКП, но дальнейшие исследования не смогли обнаружить нейронных гребневидных ПКП в развивающейся печени. Кроме того, эта концепция была поставлена под сомнение микроскопическим анализом, который показал, что перисинусоидальные клетки, по-видимому, происходят из мезенхимальных клеток, расположенных в субэндотелиальном пространстве поперечной перегородки. Эта точка зрения подтверждается экспрессией мезодермальных маркерных белков, таких как десмин и α -гладкомышечный актин (α -SMA или актин α 2/ACTA2), особенно в активированных ПКП [108, 183]. Другая гипотеза предполагает в качестве источника ПКП - мультипотентные мезенхимальные клетки, в частности, потому, что эти клетки также дают начало нервным клеткам, а также мезенхимальным линиям гладкомышечных клеток или адипоцитов, маркеры которых также экспрессируются ПКП [18].

Характерной особенностью ПКП в нормальной печени является их роль в транспорте и хранении витамина А (ретинола). ПКП хранят 80% общего ретинола организма в виде ретиниловых эфиров в липидных каплях цитоплазмы и регулируют как транспорт, так и хранение витамина А [70, 278].

Аутофлуоресценция витамина А позволяет визуализировать ПКП вдоль печеночных синусоидов. ПКП также вносят свой вклад в трехмерную архитектуру нормальной печени. Они регулируют оборот внеклеточного матрикса в пространстве Диссе путем секреции молекул внеклеточного матрикса, сопровождаемого секрецией матриксных металлопротеиназ (ММП) и их тканевых ингибиторов (ТИМП) [62, 193].

Кроме того, ПКП являются важнейшими регуляторами регенерации печени, как это происходит после частичной гепатэктомии. Печень обладает высокой способностью к регенерации, и после резекции двух третей печени печеночная масса почти полностью восстанавливается через 2 недели. ПКП способны генерировать клетки гепатоцитарного и эндотелиального происхождения и таким образом могут непосредственно поддерживать обновление поврежденной ткани печени [30]. ПКП способны активировать регенерацию печени и тормозить ее через межклеточные взаимодействия и синтез цитокинов [38]. Более того, ПКП участвуют в регуляции синусоидального тонуса и в настоящее время рассматриваются как основные клетки, участвующие в регуляции синусоидального кровотока [62].

Кроме того, ПКП проявляют иммунологические свойства, такие как модуляция иммунологической толерантности печени. Печень считается иммунно-привилегированным органом. Например, реципиенты аллотрансплантатов печени человека нуждаются в меньшей иммуносупрессии, чем это необходимо для других органов. ПКП способны усиливать дифференцировку и накопление регуляторных Т-клеток, которые вносят значительный вклад в реализацию иммунологической толерантности печени [70, 132]. ПКП могут действовать как антиген-презентирующие клетки, обладают способностью взаимодействовать с иммунными клетками и модулировать их активность или способствовать их дифференцировке (рис. 1). Например, ПКП обладают выраженной Т-клеточной ингибирующей

активностью *in vitro*, и активация ПКП связана с усилением экспрессии В7-Н1 (CD274, death-ligand 1), который играет важную роль в подавлении адаптивных иммунных реакций. Интересно, что ПКП в состоянии покоя не экспрессируют этот трансмембранный белок, но он заметно повышается после активации ПКП интерфероном- γ (ИФН- γ) или контакта с активированными Т-клетками.

ПКП взаимодействуют с иммунными клетками двояким образом. Они с одной стороны сами получают множество сигналов от иммунных клеток и, с другой стороны, в свою очередь, сами синтезируют растворимые медиаторы воспаления, которые, влияют на биологические свойства иммунных клеток. Важными сигнальными путями для активации ПКП являются, например, транскрипционный ядерный фактор NF- κ B, который участвует в активации ПКП при стимуляции TLR4. При нарушении кровотока в печени ПКП продуцируют активные формы кислорода, провоспалительные цитокины, хемокины и их рецепторы и могут действовать как антиген-презентирующие клетки. С другой стороны, эксперименты показали, что дефицит ПКП связан с повышенной экспрессией интерлейкина 10 (IL-10) и IFN- γ и что активированные ПКП усиливают ответ на повреждение печени. Все эти исследования показывают, что ПКП в значительной степени способствуют развитию иммунитета печени и участвуют в его реализации [179, 197].

В физиологических условиях ПКП находятся в стадии покоя. После повреждения печени ПКП подвергаются процессу активации до высокопролиферативного, миофибробластоподобного типа клеток. Активация ПКП в пораженной печени морфологически характеризуется увеличением гранулярности эндоплазматического ретикулума, потерей каплей витамина А и появлением сократительных нитей. Повышается экспрессия цитоскелетного белка - актина гладкомышечных клеток (α -SMA), который придает

повышенный сократительный потенциал, и таким образом, α -SMA считается маркером активированных ПКП [38, 183].

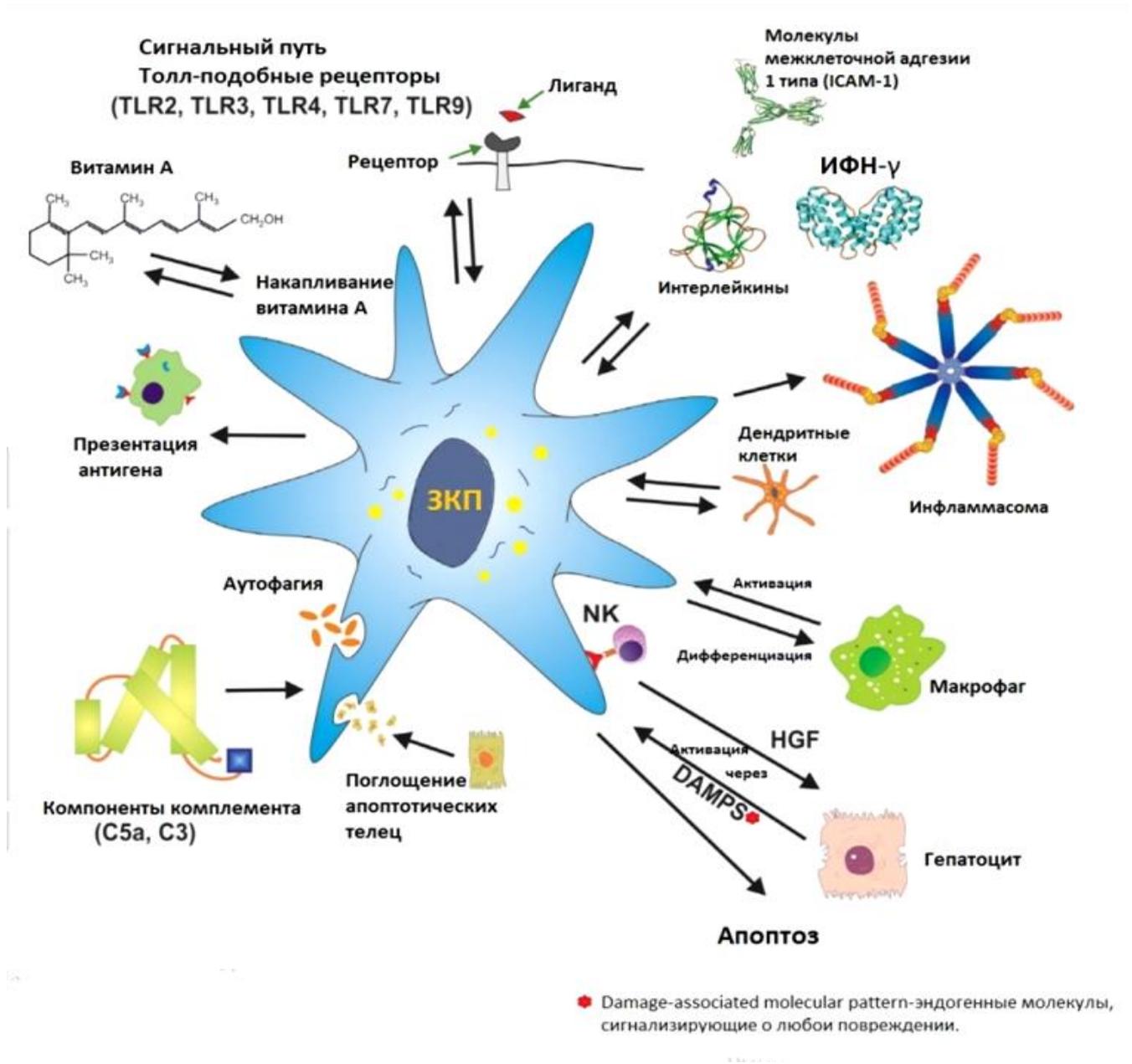


Рисунок 1. Перисинусоидальные клетки печени в иммунологии
(цитируется по R. Weiskirchen et al., 2014)

Морфологически активированные ПКП характеризуются вытянутой формой, напоминающей фибробласты, выраженным белоксинтезирующим компартментом и формированием в цитоплазме контрактильных

фибриллярных структур. Активированные ПКП синтезируют и выделяют большое количество компонентов внеклеточного матрикса, таких как коллаген, протеогликан, гликозаминогликан и гликопротеин. Накопление внеклеточного матрикса дополнительно усиливается за счет выработки ТИМП, которые предотвращают его деградацию, приводя к накоплению внеклеточного матрикса с постепенным нарушением нормальной архитектуры печени [315].

При активации ПКП также происходит резкое изменение и усиление экспрессии и секреции, многочисленных про- и противовоспалительных цитокинов и факторов роста [70, 122]. Наиболее мощным индуктором экспрессии коллагена I и других компонентов внеклеточного матрикса ПКП является трансформирующий фактор роста- β (TGF- β). TGF- β – главный профиброгенный цитокин, который при повреждении ткани печени стимулирует активацию ПКП, приобретающих в результате свойства миофибробластов [183]. Тромбоцитарный фактор роста (PDGF) также является мощным индуктором пролиферации ПКП [197].

1.12. Роль активированных перисинусоидальных клеток печени

Активация ПКП является ключевым событием фиброгенеза печени. Фиброз при хроническом заболевании можно рассматривать как нерегулируемое заживление ран. Стойкая гепатоцеллюлярная травма приводит к активации ПКП с усилением синтеза внеклеточного матрикса и нарушению его деградации (фибролиз). Повышенное отложение внеклеточного матрикса приводит к постепенному нарушению нормальной архитектуры печени и в конечном итоге к циррозу печени [27, 38, 232]. Наиболее изученным компонентом внеклеточного матрикса при фиброзе печени является коллаген I типа. Вместе с другими ПКП-продуцируемыми компонентами внеклеточного матрикса, такими как сульфатированные

протеогликаны и адгезивные гликопротеины, коллаген I образует фиброзные полосы, окружающие узелки в цирротической печени.

Однако, уже раннее отложение внеклеточного матрикса в субэндотелиальном пространстве Диссе - так называемая «капилляризация» синусоидов, вызывает снижение функции печени [32, 62, 239]. Активированные ПКП также являются значимыми медиаторами иммунорегуляции печени. Они секретируют множество различных хемокинов и цитокинов, таких как ИЛ-6, ИЛ-8, моноцитарный хемотаксический пептид-1 (MCP-1). Таким образом, ПКП инициируют и усиливают воспаление печени, индуцируя инфильтрацию моно - и полиморфноядерными лейкоцитами. В дальнейшем, активированные ПКП способствуют активации макрофагов печени с провоспалительной и профибротической функциями [33, 70]. Кроме того, они продуцируют белок комплемента C4, который способствует развитию воспалительной реакции печени. Активированные ПКП также функционируют как антигенпрезентирующие клетки, которые могут стимулировать пролиферацию или апоптоз лимфоцитов. Кроме того, активированные ПКП модулируют печеночный иммунный ответ путем экспрессии костимулирующих молекул в виде B7-H1 (PDL-1, death-ligand 1), который играет решающую роль в регуляции апоптоза Т-клеток [48, 122]. Также активированные ПКП экспрессируют Toll-подобные рецепторы 4 и 9, что указывает на их способность взаимодействовать с бактериальными продуктами. Помимо их решающей роли в развитии воспаления и фиброза печени, активированные ПКП играют важную роль в патогенезе портальной гипертензии. Согласно их миофибробластическому фенотипу, активированные ПКП отвечают сокращением на вазоактивные вещества, такие как эндотелин 1 и ангиотензин II [100, 132].

В последние годы участие ПКП в развитии фиброза печени все больше подвергается сомнению [193]. Известно, что ПКП способны к синтезу

фермента – матриксной металлопротеиназы 9 – ММР 9. Этот фермент участвует в расщеплении белков внеклеточного матрикса. ПКП за счет секреции компонентов межклеточного матрикса и металлопротеиназ, которые их расщепляют, участвуют в ремоделировании внеклеточного матрикса [197, 308].

С момента открытия этих клеток более 100 лет назад, сделано несколько открытий в области строения и функции этих клеток. Таким образом, представляется перспективным дальнейшее выяснение роли ПКП в регенерации печени в физиологических условиях и в условиях патологии. Кроме того, важное значение имеет оценка взаимодействия ПКП с другими клетками печени. Также остается неясным, может ли процесс активации ПКП быть реверсирован *in vivo*, что послужило бы еще одним доказательством поразительной пластичности этих клеток.

1.13. Методы выделения перисинусоидальных клеток печени

Развитие методов выделения и культивирования ПКП расширило возможности для изучения функций этой клетки в патофизиологии печени. Knook et al., используя центрифугирование по градиенту плотности, впервые выделили ПКП из печени крыс [109]. Впоследствии Фридман сообщил о первом выделении и характеристике ПКП человека из нормальной печени. С развитием методов выделения, культивирования и характеристики ПКП были достигнуты значительные успехи в изучении функций ПКП в физиологических условиях и при патологии печени [133, 166].

Описаны два основных метода выделения ПКП из печени человека: один заключается в выделении клеток из эксплантов ткани печени, а другой - в использовании центрифугирования по градиенту плотности, аналогичного выделению ПКП у грызунов [152, 200].

Выделение перисинусоидальных клеток печени из эксплантов печени.

Методика культивирования миофибробластов, выделенных из эксплантов печени человека нормальной и фиброзной форм печени, были описаны около 40 лет назад [205, 241]. Фрагменты ткани прикреплялись к пластиковому субстрату. Рост клеток с миофибробластными характеристиками обнаруживался через 10-15 дней, а миофибробластические клетки выделялись и пересеивались с помощью трипсина через 3-4 недели культивирования из эксплантов срезов печени. Как правило, исследования проводились на однородных культурах «гладкомышечных клеток», субкультивированных между тремя и десятью пассажами, без заметных фенотипических изменений и значительных вариаций результатов от различных пассажей. ПКП / миофибробласты, выращенные из эксплантов печени человека, представляют собой полезную исследовательскую модель для изучения фиброгенеза человека. Клетки позитивны на десмин и гладкомышечный α -актин и демонстрируют признаки, характерные для миофибробластов, такие как обилие грубого эндоплазматического ретикулама и пучки микрофиламентов при электронной микроскопии. Типичные липидные капли не были обнаружены, так как эти клетки содержались в культуре достаточно долго. Они экспрессировали коллаген I, III, IV и V типов, а также цепь ламинина B1, фибронектин, матриксную металлопротеиназу-2 (ММП-2) и белок активации фибробластов [234, 259].

Ограничения этого подхода выделения ПКП включают потенциальную гетерогенность клеток в культуре. В этих условиях из ткани печени вырастали два типа клеток: напоминающие гладкомышечные клетки и сосудистый эндотелий, в то время как эпителиальные клетки в этих субкультурах больше не присутствовали. Кроме того, используя этот метод культивирования, ранние события активации ПКП не могут быть прослежены и исследованы, так как требуются недели для того, чтобы клетки выросли из ткани печени на пластиковую поверхность.

Выделение перисинусоидальных клеток печени методом центрифугирования по градиенту плотности

Исследователи выделяли человеческие ПКП из клиновидных срезов печени человека в течение 48 ч. [200]. Срезы донорской печени получали методом катетерной перфузии или тонко измельчали и обрабатывали растворами ферментов проназы и коллагеназы с последующим центрифугированием по градиенту плотности с использованием градиентной среды для удаления других непаренхиматозных клеток. ПКП, выделенные этим методом, обладают высокой жизнеспособностью и чистотой до 90%. В некоторых исследованиях ПКП, выделенные центрифугированием по градиенту плотности, дополнительно обогащались и очищались центробежным элюированием [241]. Выделенные таким образом ПКП демонстрируют аутофлуоресценцию витамина А с многочисленными липидными каплями в перинуклеарной зоне. Ретиноидные капли выдерживали в течение 9 дней на непокрытом пластике с последующей потерей капель витамина А и изменением морфологии ПКП до фибробластической с экспрессией компонентов матрикса, включая α -SMA. И наоборот, клетки, культивируемые на мембрано-подобном геле оставались сгруппированными и сохраняли флуоресценцию витамина А. Трансмиссионная электронная микроскопия продемонстрировала обильные ретиноидные капли, заметные шероховатости эндоплазматического ретикулула и микрофиламенты. Исследование экспрессии цитоскелетных и матриксных белков показало, что экспрессия десмина была отрицательной в ПКП в течение 2-3 дней культивирования и наблюдалась только в клетках в более длительной культуре (более 7 дней). Были идентифицированы виментин, коллагены I, III, IV и ламинин. Исследователи обнаружили, что выделенные таким образом ПКП, отвечают на вазоконстрикторы, такие как тромбин, ангиотензин-II и эндотелин-1, предполагая их роль в регуляции синусоидального кровотока

[193]. Культивированные ПКП продуцировали моноцитарный хемотаксический белок-1 (MCP-1) и реагировали на TGF- β 1 повышением PDGFR β (рецептор тромбоцитарного фактора роста). Разделение по градиенту плотности остается наиболее широко используемым подходом для выделения ПКП, но т.к. этот метод нацелен на «плавучесть» богатых витамином А ПКП, это может привести к неэффективности изоляции «активированных» ПКП. Было показано, что при повреждении печени у крыс большое количество ПКП извлекалось из слоев градиента более высокой плотности [133, 158].

Выделение перисинусоидальных клеток печени, основанное на эндогенной флуоресценции клеток

Используя способность ПКП хранить ретиноидные капли, была получена популяция ПКП путем сортировки их на основе эндогенной флуоресценции витамина А с высоким боковым рассеянием падающего света. Недостатком этого метода является меньший выход, более высокая стоимость и необходимость флуоресцентно-активированной сортировки клеток. Этот метод, однако, остается ценным для получения чистых перисинусоидальных клеток печени. Важно отметить, что при выделении ПКП человека основной проблемой является «загрязнение» гепатоцитов, особенно при стеатозе печени, в которой «загрязненные» гепатоциты также генерируют сильную аутофлуоресценцию, что затрудняет сортировку ПКП [197, 256].

Маркеры перисинусоидальных клеток печени

Исследования на грызунах выявили специфические маркеры ПКП. Наиболее заметные белки, идентифицированные в ПКП грызунов, включают desmin, GFAP (Glial fibrillary acidic protein) и α -SMA (при активации). Однако маркеры ПКП грызунов и человека отличаются и профиль экспрессии белка ПКП человека отличается от ПКП мыши. В частности, не идентифицируются

десмин или GFAP-позитивные клетки среди ПКП человека в физиологических условиях [46, 62, 70, 179].

1.14. Особенности регенерации печени при старении

Процесс регенерации печени включает в себя множество клеточных процессов, связанных с цитокинами и факторами роста. Важным фактором активации регенерации печени является повышение уровня фактора некроза опухоли (ФНО) и интерлейкина-6 (ИЛ-6), что, например, происходит после резекции печени. Активация транскрипционного ядерного фактора $\kappa\text{NF-}\kappa\text{B}$, приводит к активации фактора транскрипции 3 (STAT3). Цитокиновая сеть инициируется через связывание ФНО с ФНО-рецептором I типа - мембранным рецептором, который приводит к активации $\text{NF-}\kappa\text{B}$ в непаренхиматозных клетка. Это, в свою очередь, приводит к повышению продукции ИЛ-6 и активации STAT3 в гепатоцитах. Одним из механизмов, который мог бы вызвать активацию этой сети, является молекула липополисахарида (ЛПС), которая высвобождается в портальную циркуляцию при резекции печени [17, 43, 52, 103, 144].

Цитокиновая сеть выступает в качестве первой фазы регенерации печени, которая направляет клеточный цикл гепатоцитов от G0 до G1. Последующее развитие клеточного цикла определяется действием ростовых факторов, к которым относятся: фактор роста гепатоцитов (Hepatocyte growth factor - HGF) и эпидермальный фактор роста (epidermal growth factor - EGF). HGF синтезируется перисинусоидальными клетками печени, и в организме имеет разнообразные эффекты, от митогенных до морфогенных эффектов. Стимуляция рецепторов тирозинкиназы к HGF (c-met) и рецепторов лигандов EGF (EGFR), таких как гепаринсвязывающий EGF-подобный фактор роста (HB-EGF), трансформирующий фактор роста (TGF- α), способствуют активации

внутриклеточных сигнальных путей в гепатоцитах, которые регулируют факторы транскрипции, участвующие в регенерации печени с конца G1 до фазы S. Взаимодействие между цитокинами и сигнальным фактором роста активирует пути, необходимые для выживания, пролиферации и роста гепатоцитов после какого-либо повреждения. В процессе регенерации увеличиваются размеры печеночных долек и их объем, почти вдвое увеличиваются размеры гепатоцитов [40, 65, 116, 213, 244].

С возрастом происходит выраженное снижение скорости регенерации печени. Это проявляется в заметном увеличении смертности при заболеваниях печени у пожилых людей по сравнению с молодыми. Имеются данные о 4-кратном увеличении смертности от заболеваний печени среди пациентов, возраст которых больше 65 лет по сравнению с пациентами моложе 45 лет. При старении после резекции гепатоциты меньше вступают в S-фазу. У старых животных снижается пролиферативный ответ гепатоцитов на факторы роста, в частности на эндотелиальный фактор роста (EGF), что говорит о нарушении чувствительности клеток старого организма к ростовым факторам [73, 87, 113, 174].

Старение нарушает регенерацию печени, воздействуя на несколько путей, результатом чего является снижение скорости регенерации, но не способность восстановления массы органа. Старение связано с различными морфологическими изменениями в печени, но их основные механизмы все еще не ясны. Печень прогрессивно сокращается на 20-40% в течение жизни человека, наблюдается возрастное уменьшение объема печени. С возрастом происходит увеличение размеров гепатоцитов, изменяется соотношение ядра и цитоплазмы гепатоцита. Печень при старении имеет тенденцию к развитию макро- и полиплоидных гепатоцитов с увеличенными ядрами и ядрышками. После 85 лет около 27% гепатоцитов человека демонстрируют полиплоидию по сравнению с примерно 6% у людей в возрасте до 20 лет [12, 14, 102, 263].

Классический грубый внешний вид печени у пожилых людей известен как «коричневая атрофия», и коричневый цвет обусловлен накоплением высокоокисленных нерастворимых белков, известных как липофусцин, хранящихся в гепатоцитах. Считается, что эти накопления связаны с хроническим окислительным стрессом и сниженной способностью клеток к деградации поврежденных и денатурированных белков. Липофусцин улавливает катионы металлов, стимулирует образование свободных радикалов. Другие субклеточные изменения гепатоцитов с возрастом включают заметное снижение гладкой поверхности эндоплазматического ретикулума, что коррелирует со снижением концентрации микросомальных белков печени, уменьшением ферментативной активности [37, 119, 165].

Несмотря на морфологические изменения, развивающиеся в печени при старении, нет убедительных данных, свидетельствующих о нарушении функции печени при старении. Содержание сывороточный билирубин и классические ферменты не изменяются с возрастом. Однако чувствительные тесты функции печени демонстрируют небольшое снижение с возрастом. Это было подтверждено в экспериментальных исследованиях, которые продемонстрировали изменения мРНК в генах, участвующих в клеточном стрессе и фиброзе. С возрастом синтез альбумина несколько снижается. Пожилые люди имеют более высокую частоту острой печеночной недостаточности и более высокую смертность при остром гепатите А [189, 225, 255].

Хотя печень пожилых людей характеризуется снижением адаптивной реактивности и снижением резервных возможностей, клинические тесты показывают, что функция печени хорошо поддерживается в этой возрастной группе. В ряде исследований были продемонстрированы умеренные возрастные изменения в функции желчевыводящих путей, включая снижение потока желчи и секреции желчных кислот. У пациентов пожилого возраста

наблюдается снижение печеночного клиренса некоторых лекарственных средств и выраженное увеличение частоты побочных реакций на лекарственные средства, что может быть связано с нарушением печеночного кровотока, развивающимся с возрастом. Известный гепатолог Ганс Поппер утверждал, что «старение оказывает ограниченное влияние на конститутивные функции печени, но значительно влияет на ее реакцию, на повреждающие факторы» [85].

Заключение

Данные, приведенные в обзоре литературы, свидетельствуют о том, что разработка эффективных методов клеточной трансплантации в настоящее время находится в центре внимания исследований во всем мире. Благодаря способности стволовых клеток к дифференцировке в любой тип ткани, они обладают огромным потенциалом в терапии различных заболеваний и травматических повреждений. Терапия стволовыми клетками может стать ценным дополнением и альтернативой трансплантации печени и имеет огромный потенциал в лечении острой печеночной недостаточности. Исследуются различные типы клеток и их источники для применения в регенеративной медицине. Плацента - это уникальный орган, который играет важную роль в развитии плода. Стволовые клетки, полученные из плаценты, являются более перспективными для использования в регенеративной медицине. В связи с этим в данном исследовании источником для выделения ММСК и ГСК являлась плацента.

Из-за своих трофических и иммуномодулирующих функций ММСК обладают большими преимуществами в регенеративной медицине. Было показано, что ММСК создают иммуносупрессивное микроокружение, тем самым избегая аллогенного отторжения. Котрансплантация ММСК и ГСК способна продемонстрировать синергические эффекты этих двух популяций в

регенерации печени; кроме того, предполагается, что ММСК способствуют приживлению ГСК.

Большую роль в регенерации печени играют ПКП. В нормальной неповрежденной печени ПКП являются местом для хранения витамина А, однако при активации эти клетки приобретают миофибробластоподобное состояние, секретируя компоненты межклеточного матрикса, что приводит к рубцеванию ткани и фиброзу печени. Тем не менее, гипотеза об участии перисинусоидальных клеток печени в развитии фиброза печени все больше подвергается сомнению. Известно, что ПКП способны к синтезу фермента ММР9. Этот фермент, благодаря протеолитической активности, участвует в расщеплении белков внеклеточного матрикса. ПКП через синтез компонентов межклеточного матрикса и металлопротеиназ, которые их расщепляют, участвуют в ремоделировании внеклеточного матрикса, что делает их перспективными для лечения патологии печени. Ремоделируя внеклеточный матрикс, ПКП участвуют в образовании соединительнотканного каркаса для регенерации паренхиматозных клеток печени.

В литературе отсутствуют работы, посвященные применению сочетанной трансплантации ММСК и ГСК, а также котрансплантации ММСК и ПКП для восстановления морфофункционального состояния печени при ее повреждении с учетом возрастной инволюции организма.

ГЛАВА 2. МЕТОДИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Дизайн исследования

Эксперименты проведены на 378 зрелых и 378 старых белых аутбредных мышах-самцах. Возраст зрелых животных составлял 6-8 месяцев, масса - 26-28 г, возраст старых животных - 16-17 мес., масса - 31–33 г. Проведение экспериментальных исследований было связано с необходимостью выполнения поставленной задачи - оценки морфофункциональных изменений печени при ее повреждении. Для реализации данной задачи необходимо было моделирование патологии печени, определение лабораторных показателей крови, морфометрических показателей, что требовало проведения инвазивных вмешательств. Постановка методики выделения и культивирования ММСК, выделения ГСК выполнена из хориона плаценты 56 мышей-самок возраста 3-4 месяца, срок гестации – 18 дней. Получение ПКП выполнено из печени 15 мышей, возраст которых составлял 6-8 мес., масса - 26-28 г. Животные содержались в стандартных условиях лабораторного вивария, предусмотренных «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденных Приказом МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г. и Приказом МЗ СССР № 1179 от 10.10.1983 «Об утверждении нормативов затрат кормов для лабораторных животных в учреждениях здравоохранения». Манипуляции с экспериментальными животными выполнялись в соответствии с положениями Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным, методическими рекомендациями по выведению из опыта и эвтаназии.

Содержание животных осуществлялось при температуре 18 - 20,5°C, обеспечивался свободный доступ к воде и пище. В эксперименте были задействованы здоровые животные, прошедшие двухнедельную адаптацию к условиям вивария.

Распределение лабораторных мышей по сериям экспериментов представлено на рисунке 2.



Рисунок 2. Схема эксперимента

В исследовании выделили опытную и контрольную группы животных. Животным опытных групп осуществлялось введение в латеральную хвостовую вену ММСК в количестве 120 тыс. кл./мышь, ГСК в количестве 10 тыс. кл./мышь, ПКП в дозе 270 тыс. кл./мышь. Клетки суспендированы в 0,2 мл 0,9 % раствора NaCl. В данном исследовании не проводилось изучение влияния на морфофункциональные показатели печени трансплантации отдельно ГСК и ПКП в связи с тем, что аллогенная трансплантация сопряжена с развитием иммунологических конфликтов. Изучение этих видов клеток производилось под «защитой» ММСК (путем проведения сочетанной трансплантации двух видов клеток), иммуносупрессивные свойства которых позволяют избежать иммунологических конфликтов.

Каждой опытной группе животных соответствовала контрольная группа, которой производилось введение 0,2 мл 0,9% раствора NaCl. Введение клеток осуществлялось в физиологических условиях (без моделирования патологии печени) и через 1 час после частичной гепатэктомии, моделирования

токсического повреждения печени. Также была выделена группа сравнения – животные без моделирования патологического воздействия и без введения клеток. В каждой группе было по 7 лабораторных мышей (таблица 1). Проводили оценку биохимических показателей крови и морфометрических показателей печени через одни, трое и семь суток после введения клеток.

Таблица 1 Распределение мышей по сериям экспериментов

		Клетки	Количество клеток	Время выведения мышей из эксперимента		
				1 сутки	3 сутки	7 сутки
1	2	3	4	5	6	7
Физиологические условия	Зрелые	ММСК (опытная группа)	120 тыс. кл./мышь в 0,2 мл 0,9% р-ра NaCl	7 шт.	7 шт.	7 шт.
		ММСК+ГСК (опытная группа)	120 тыс. кл./мышь + 10 тыс.кл/мышь в 0,2 мл 0,9 % р-ра NaCl	7 шт.	7 шт.	7 шт.
		ММСК+ПКП (опытная группа)	120 тыс. кл./мышь + 270 тыс. кл/мышь в 0,2 мл 0,9 % р-ра NaCl	7 шт.	7 шт.	7 шт.
		0,9% р-р NaCl (группа сравнения)	0,2 мл	7 шт.	7 шт.	7 шт.
	Старые	ММСК (опытная группа)	120 тыс. кл./мышь в 0,2 мл 0,9% р-ра NaCl	7 шт.	7 шт.	7 шт.
		ММСК+ГСК (опытная группа)	120 тыс. кл./мышь + 10 тыс.кл/мышь в 0,2 мл 0,9 % р-ра NaCl	7 шт.	7 шт.	7 шт.
		ММСК+ПКП (опытная группа)	120 тыс. кл./мышь + 270 тыс. кл/мышь в 0,2 мл 0,9% р-ра NaCl	7 шт.	7 шт.	7 шт.
		0,9% р-р NaCl (группа сравнения)	0,2 мл	7 шт.	7 шт.	7 шт.
Частичная гепатэктомия	Зрелые	ММСК (опытная группа)	120 тыс. кл./мышь в 0,2 мл 0,9% р-ра NaCl	7 шт.	7 шт.	7 шт.
		ММСК+ГСК (опытная группа)	120 тыс. кл./мышь + 10 тыс.кл/мышь в 0,2 мл 0,9% р-ра NaCl	7 шт.	7 шт.	7 шт.
		ММСК+ПКП (опытная группа)	120 тыс. кл./мышь + 270 тыс. кл/мышь в 0,2 мл 0,9% р-ра NaCl	7 шт.	7 шт.	7 шт.
		0,9% р-р NaCl (контрольная группа)	0,2 мл	7 шт.	7 шт.	7 шт.
	Старые	ММСК (опытная группа)	120 тыс. кл./мышь в 0,2 мл 0,9% р-ра NaCl	7 шт.	7 шт.	7 шт.
		ММСК+ГСК (опытная группа)	120 тыс. кл./мышь + 10 тыс.кл/мышь в 0,2 мл 0,9 % р-ра NaCl	7 шт.	7 шт.	7 шт.
		ММСК+ПКП (опытная группа)	120 тыс. кл./мышь + 270 тыс. кл/мышь в 0,2 мл 0,9 % р-ра NaCl	7 шт.	7 шт.	7 шт.
		0,9 % р-р NaCl (контрольная группа)	0,2 мл	7 шт.	7 шт.	7 шт.

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7
ММСК	Зрелые	ММСК	120 тыс. кл./мышь в 0,2 мл 0,9%	7 шт.	7 шт.	7 шт.

	(опытная группа)	р-ра NaCl			
	ММСК+ГСК (опытная группа)	120 тыс. кл./мышь + 10 тыс. кл./мышь в 0,2 мл 0,9% р-ра NaCl	7 шт.	7 шт.	7 шт.
	ММСК+ПКП (опытная группа)	120 тыс. кл./мышь + 270 тыс. кл./мышь в 0,2 мл 0,9 % р-ра NaCl	7 шт.	7 шт.	7 шт.
	0,9 % р-р NaCl (контрольная группа)	0,2 мл	7 шт.	7 шт.	7 шт.
Старые	ММСК (опытная группа)	120 тыс. кл./мышь в 0,2 мл 0,9% р-ра NaCl	7 шт.	7 шт.	7 шт.
	ММСК+ГСК (опытная группа)	120 тыс. кл./мышь + 10 тыс. кл./мышь в 0,2 мл 0,9% р-ра NaCl	7 шт.	7 шт.	7 шт.
	ММСК+ПКП (опытная группа)	120 тыс. кл./мышь + 270 тыс. кл./мышь в 0,2 мл 0,9% р-ра NaCl	7 шт.	7 шт.	7 шт.
	0,9 % р-р NaCl (контрольная группа)	0,2 мл	7 шт.	7 шт.	7 шт.

Выбор сроков выведения из эксперимента коррелирует с пиками синтетической активности и восстановления клеток печени. В процессе регенерации печени после частичной гепатэктомии выделяют две фазы регенерации – предмитотическую и пролиферативную. Предмитотическая фаза может быть поделена на раннюю (переход клеток из G_0 в G_1 стадию клеточного цикла и позднюю - начало репликации ДНК ($G_1 - S$)). В печени мышей ранней стадии соответствуют первые 10 - 12 ч после операции, поздней - 12 - 24 ч после частичной гепатэктомии. Поздняя стадия регенерации печени характеризуется наибольшей интенсивностью биосинтетических процессов. В процесс деления постепенно вступают почти все сохранившиеся после резекции клетки и к концу 3 суток в состоянии пролиферации оказывается 90 - 96,6 % гепатоцитов. После 7-х суток снижается уровень проростовых сигналов, происходит возобновление ингибиторной сигнализации, восполняется масса печени и восстанавливается гомеостаз. В связи с этим сроки выведения животных из эксперимента - 1, 3, 7 сутки после частичной гепатэктомии.

2.2. Выделение, культивирование, идентификация ММСК

Планирование экспериментальной беременности лабораторных животных

Определение фаз эстрального цикла лабораторных мышей дает возможность планировать экспериментальную беременность. Для определения фазы эстрального цикла производилось взятие влагалищных мазков у лабораторных мышей-самок ежедневно утром в одно и то же время. Приготовление мазка осуществлялось следующим образом: содержимое влагалища брали с заднего свода стеклянной палочкой (диаметр 0,2 см) путем вращательных движений, наносили на чистое сухое предметное стекло. Фиксация мазка осуществлялась по методу Май-Грюнвальда, окраска по Романовскому-Гимзе.

По результатам микроскопии цитологических мазков производилось определение фазы эстрального цикла. По цитологической картине влагалищного мазка лабораторных мышей можно определить четыре фазы эстрального цикла (диэструс, проэструс, эструс, метоэструс).

В фазу течки (эструс) самка является фертильной. Самку подсаживали к самцам в соотношении 1:3. Ежедневное взятие мазков у самки продолжалось до дня обнаружения в мазке сперматозоидов. Этот день условно принимали за первый день беременности, самку отсаживали в отдельную клетку.

Выделение культуры ММСК

Выделение культуры ММСК осуществлялось согласно модифицированному методу Тепляшина А.С. с соавторами 2004 г. Лабораторных животных мышей-самок в сроке гестации 14 дней умерщвляли путем distraction позвоночника и стерилизовали в 70° спирте в течение 5-10 мин. Проводили вскрытие брюшной полости в стерильных условиях, полости матки, после чего производили выделение плаценты. Образец ткани промывали раствором NaCl - 0,9 %, забуференным фосфатами при pH 7,2. Буферный раствор содержал антибиотики (стрептомицин - 50 мкг/мл, пенициллин - 50 ед./мл). Механическое измельчение ткани проводили спомощью мелких ножниц. Ферментативную обработку (0,25%

трипсин – ЭДТА) осуществляли в течение 15 мин при 37°C. Следующим этапом было фильтрование через 10 мкм нейлоновую мембрану суспензии клеток с целью удаления крупных неизмельченных кусочков ткани. Затем для нейтрализации фермента добавляли эквивалентный объем среды α -MEM (INC, США), содержащий 10% фетальной бычьей сыворотки (Hyclone, Новая Зеландия). Далее следовало центрифугирование суспензии клеток в течение 10 мин при 1000 g. Суспендирование полученного клеточного осадка проводилось в среде α -MEM (INC, США), которая содержала 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (Hyclone, Новая Зеландия), раствор антибиотиков (Chemicon), а также раствор незаменимых аминокислот (Sigma, США). Полученную таким образом клеточную суспензию высевали на чашки Петри 60 мм (Nunc, Дания) в концентрации 150000-160000 кл/см². Культивирование клеток проводили в условиях CO₂ инкубатора, поддерживали температуру 37°C и увлажненную атмосферу с содержанием углекислого газа 5 %. Смена питательной среды осуществлялась каждые 3-4 дня. Жизнеспособность выделенных клеток определялась с помощью 7-AAD (7-Aminoactinomycin D) на проточном цитофлуорометре Beckman Coulter Navios.

7-AAD (7-Aminoactinomycin D) позволяет отличить жизнеспособные клетки от нежизнеспособных методом проточной цитометрии. Представляет собой 7-амино-актиномицин D (7-AAD), который интеркалирует между цитозиновым и гуаниновым основанием ДНК, возбуждаются с помощью 488 нм (синий), 532 нм (зеленый) и 561 нм (желто-зеленый) лазерных линий. Жизнеспособность полученной культуры составляла 95 – 97 %.

Субкультивирование ММСК

Субкультивирование клеток (пересев) осуществляли по достижении ими 70 - 80 % монослоя. Для этого производилось удаление питательной среды и добавление к культуре ММСК 5 мл 0,075 % раствора аккутазы на 25 см² культуральной поверхности. Через 2-5 секунды производилась аспирация фермента и добавление еще 5 мл 0,075 % раствора аккутазы на 25 см² культуральной поверхности. После 2-3 секунд инкубирования вновь осуществлялась аспирация раствора аккутазы. Дальнейшее инкубирование

происходило в парах фермента в течение 2 минут. Инактивировали раствор аккутазы с помощью добавления питательной среды, содержащей 10 % FBS. В дальнейшем центрифугировали суспензии клеток 5 мин при 2000 g. После удаления супернатанта, клетки вновь суспендировали, и высевали в концентрации 10000кл/см² в чашки Петри диаметром 50 см.

Направленные дифференцировки ММСК

Для оценки функциональных свойств выделенных ММСК проводили направленную дифференцировку клеток в адипоцитарном и остеогенном направлениях.

Адипоцитарная дифференцировка

Индукцию проводили по модифицированному методу М. Reyes с соавторами. Для индукции адипоцитарной дифференцировки ММСК в концентрации 2×10^4 кл/см² высевали в индуцирующую среду. Состав среды: α -МЕМ 90%, лошадиная сыворотка 10% (Sigma, США), антибиотик -гентамицин 50 мкг/мл (Invitrogen, Великобритания), дексаметазон 10^{-9} М (Sigma, США), аскорбат натрия 50 мкг/мл (ICN, США), 1x ITS (Invitrogen, Великобритания), 1x LA-BSA (Sigma, США). Смену индуцирующей среды осуществляли каждые 3-4 сут. культивирования. Культивирование проводили в течение 2-х недель.

Окраска жировым красным (Oil Red O)

ММСК после индукции дифференцировки в адипоцитарном направлении, окрашивали на липиды по методу М. Reyes с соавторами. Данная окраска позволяет окрашивать липиды в красный цвет (рисунок 3).

Приготовление раствора жирового красного (Sigma, США) осуществляли непосредственно перед окрашиванием клеток. Раствор красителя в изопропанол (0,5 %) разводили дистиллированной водой в соотношении 3/2, в дальнейшем его фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм. После этого проводили промывание клеток в растворе PBS и фиксацию в метаноле при температуре -20°C в течение 2 мин. После фиксации клетки промывали этанолом (50%) и проводили окраску раствором жирового красного в течение 10 мин. В

дальнейшем клетки вновь промывали этанолом (50 %), ополаскивали дистиллированной водой и высушивали на воздухе.

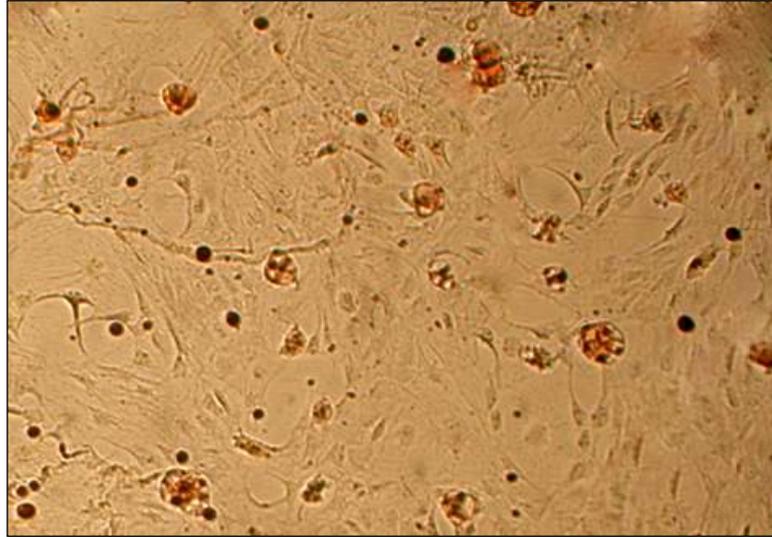


Рис. 3. ММСК, подвергнутые индукции адипоцитарной дифференцировки, окраска жировым красным. Ув.: $6,3 \times 1,6 \times 4$.

Наблюдения в ходе эксперимента показали, что первые адипоцитоподобные клетки появляются уже на 4 день индукции дифференцировки. В процессе дальнейшей обработки индукторами происходит прогрессирующее накопление жировых капель в везикулах цитоплазмы отдельных клеток. Постепенно везикулы сливаются, образуя крупную жировую каплю, характерную для зрелых адипоцитов.

Остеогенная дифференцировка

Индукцию проводили по модифицированному методу М. Reyes с соавторами. Для индукции остеогенной дифференцировки ММСК в концентрации 2×10^4 кл/см² высевали на чашки Петки и добавляли индуцирующую среду. Состав среды: стандартная среда, глицерофосфат натрия 10 mM β - (Sigma, США), дексаметазон 10^{-8} M (Sigma, США), аскорбат натрия 50 мкг/мл (ICN, США). Смену индуцирующей среды осуществляли каждые 3-4 суток культивирования в течение 2-х недель.

Постановка реакция Ван Косса

ММСК, дифференцированные в остеогенном направлении, окрашивали по методу М. Reyes с соавторами. С помощью этой окраски можно выявить в межклеточном пространстве нерастворимые соли кальция (рисунок 4). Производили фиксацию ММСК в метаноле при температуре -20°C в течение 2 мин. Затем окрашивали 2% раствором нитрата серебра (Вектон, Россия). под 60W лампой 1 час. После этого клетки промывали дистиллированной водой, добавляли 2,5 % раствор тиосульфата натрия и инкубировали в течение 5 мин. После окраски проводили повторное промывание клеток дистиллированной водой и высушивали на воздухе.

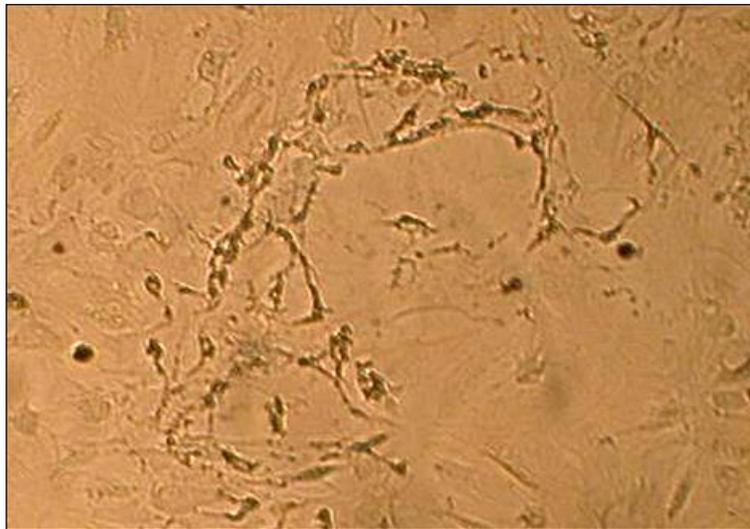


Рис. 4. ММСК, подвергнутые остеогенной дифференцировке.
Реакция Ван Косса. Ув.: $6,3 \times 1,6 \times 4$

Обильные включения кальция в межклеточных пространствах однозначно указывают на остеогенную дифференцировку.

Живые культуры и окрашенные гистохимическими методами клеточные препараты фотографировали с помощью инвертированного микроскопа (Unico, США).

Имунофенотипирование ММСК

ММСК фенотипировались методом проточной цитометрии на проточном цитометре Navios (Beckman Coulter, США). Исследование проводили совместно

с к.м.н. Партыловой Е.А. – врачом клинической лабораторной диагностики ГБУЗ СО «Свердловская областная клиническая больница № 1». Для проведения исследования использовали моноклональные антитела, конъюгированные с флуорохромами (Becton Dickinson, США). Производили оценку содержания ММСК с иммунофенотипом CD29+, CD105+, Sca-1+, CD45- в суспензии трансплантируемых клеток (рисунок 5). Для этого использовали набор Mouse Mesenchymal Stem Cell Multi-Color Flow Cytometry Kit (Bio-Techne, США)

1. Суспензию клеток промывали 2 мл раствора окрашивающего буфера Staining Buffer (Bio-Techne, США)
2. В течение 5 мин. проводили центрифугирование при 300 x g.
3. Добавили по 5 мкл каждого антитела:
4. Полученный клеточный осадок довели фосфатным буфером (PBS) до концентрации 1×10^6 клеток/200 мкл.
5. К суспензии клеток добавили антитела Sca-1-APC, CD29/Integrin β 1-PE, CD105/Endotelin-CFS, CD45-PerCP по 10 мкл каждого.
6. Инкубировали в темноте при 18°C 40 минут.
7. Клетки промыли раствором - Staining Buffer (Bio-Techne, США) для удаления лишних антител.

Жизнеспособность определяли с помощью 7-AAD. ММСК с фенотипом 7AAD-CD45-CD105+Sca1+CD29+ в суспензии трансплантируемых клеток составило 93,5 % (рисунок 4).

Ежедневно проводилась оценка работы проточного цитометра. Для этого использовали калибровочные частицы Flow Chek Fluorespheres (Beckman Coulter, США) и стандартные протоколы настройки прибора.

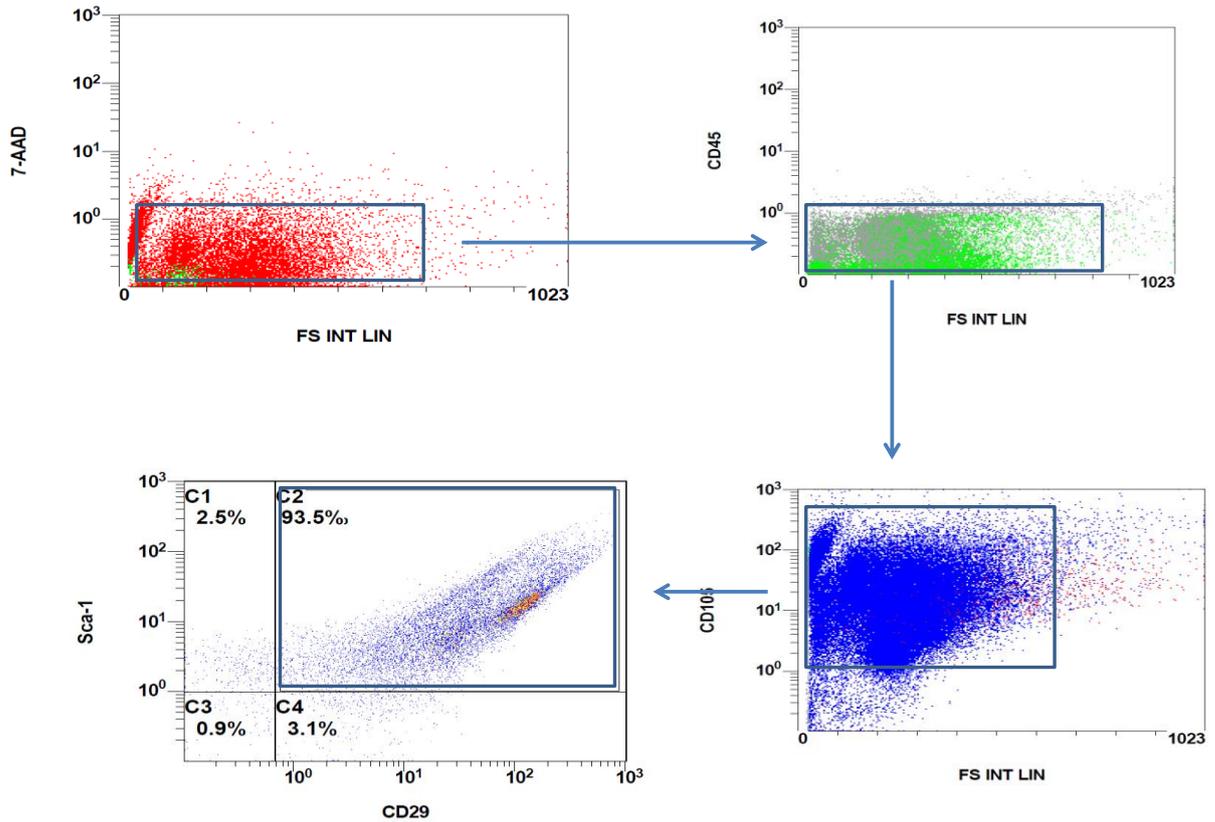


Рис. 5. Последовательность гейтирования для получения ММСК с фенотипом CD45⁻, CD105⁺, Sca1⁺, CD29⁺

2.3. Выделение гемопоэтических стволовых клеток из хориона плаценты

Методы фенотипирования мышинных ГСК основаны на коэкспрессии (совместной экспрессии) поверхностных белков C-Kit (CD-117) и Sca-1 в сочетании с отсутствием маркеров линии (Lin), которые обычно присутствуют на зрелых клетках крови, таких как Т- и В-лимфоциты, НК-клетки, гранулоциты, макрофаги/ моноциты и эритроциты.

Выделение гемопоэтических стволовых клеток проводили методом позитивной иммуномагнитной сепарации по антигенам CD 117 и SCA-1.

SCA-1 позитивная иммуномагнитная сепарация

Методика SCA-1 позитивной иммуномагнитной сепарации осуществлялась с использованием набора EasySep Mouse SCA 1 Positive Selection Kit (StemCell Technologies, Канада). Набор нацелен на выделение Sca-1 положительных клеток.

Нужные клетки метятся антителами и магнитными частицами, используется магнит EasySep.

1. Полученная клеточная суспензия была пропущена через нейлоновый фильтр 70 мкм. Затем центрифугировали 10 мин. при 300 x g. После этого клетки ресуспендировали в количестве 1×10^8 клеток/мл в буфере для иммуномагнитной сепарации (состав буфера производитель не указывает, StemCell Technologies, Канада).

2. Суспензию клеток переместили в 5 мл пробирку после чего добавили в нее 50 мкл/мл первичных моноклональных антител - Mouse Sca 1 PE Labeling Reagent (StemCell Technologies, Канада).

3. Инкубировали клетки 15 мин. при 18-20°C без доступа света

4. Добавили вторичные моноклональные антитела PE Selection Cocktail (StemCell Technologies, Канада) в количестве 70 мкл/мл.

5. В течение 15 мин инкубировали при комнатной температуре в темноте.

6. Добавили магнитные частицы Dextran RapidSpheres (StemCell Technologies, Канада) в концентрации 50 мкл/мл.

7. В течение 10 мин инкубировали при комнатной температуре в темноте.

8. Довели объем суспензии клеток до 2,5 мл буфером для иммуномагнитной сепарации.

9. Поместили пробирку с клетками в магнит (StemCell Technologies, Канада). Инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре.

10. Магнит вместе с пробиркой перевернули для удаления SCA-1 отрицательной фракции клеток.

11. Вынули пробирку из магнита и вновь добавили 2,5 мл буфера для иммуномагнитной сепарации.

12. Пробирку опять поместили в магнит и инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре.

13. Таким образом, этапы удаления SCA-1 отрицательной фракции клеток повторили трижды.

Таким образом, была получена фракция гемопоэтических стволовых клеток, положительная по SCA-1- маркер гемопоэтических стволовых клеток.

Аналогичным способом была проведена CD 117 позитивная иммуномагнитная сепарация. Методика CD117 позитивной иммуномагнитной сепарации осуществлялась с использованием набора EasySep Mouse CD 117 (cKIT) Positive Selection Kit.

Имунофенотипирование ГСК

ГСК фенотипировались методом проточной цитометрии на проточном цитометре Beckman Coulter Navios (США). Для проведения анализа использовали моноклональные антитела, конъюгированные с флуорохромами (Becton Dickinson, США). Оценивали содержание ГСК с иммунофенотипом 7-AAD-, Lin-, Sca1+, CD117+ в суспензии клеток до и после проведения иммуномагнитной сепарации. 7-AAD использовали для определения жизнеспособности клеток. 7-AAD отрицательные клетки являются жизнеспособными.

Определяли Lin- антигены на поверхности клеток. Lin – антигены, характерные для лимфоцитов (С3е), гранулоцитов (Ly-6G), макрофагов (M1/70). Исследование проводили с использованием набора антител – FITC anti-mouse Lineage Cocktail with isotype control (Biolegend, США).

Изотипическим контролем для первичных антител были антитела PE labeled Rat IgG2a, kappa isotype control (Becton Dickinson, США).

В результате проведенных исследований получено, что до проведения иммуномагнитной сепарации количество жизнеспособных клеток с фенотипом 7AAD-, Lin-, Sca1+, CD117+ составляло 1,7% (рисунок 6), после проведения иммуномагнитной сепарации – 95,6% (рисунок 7).

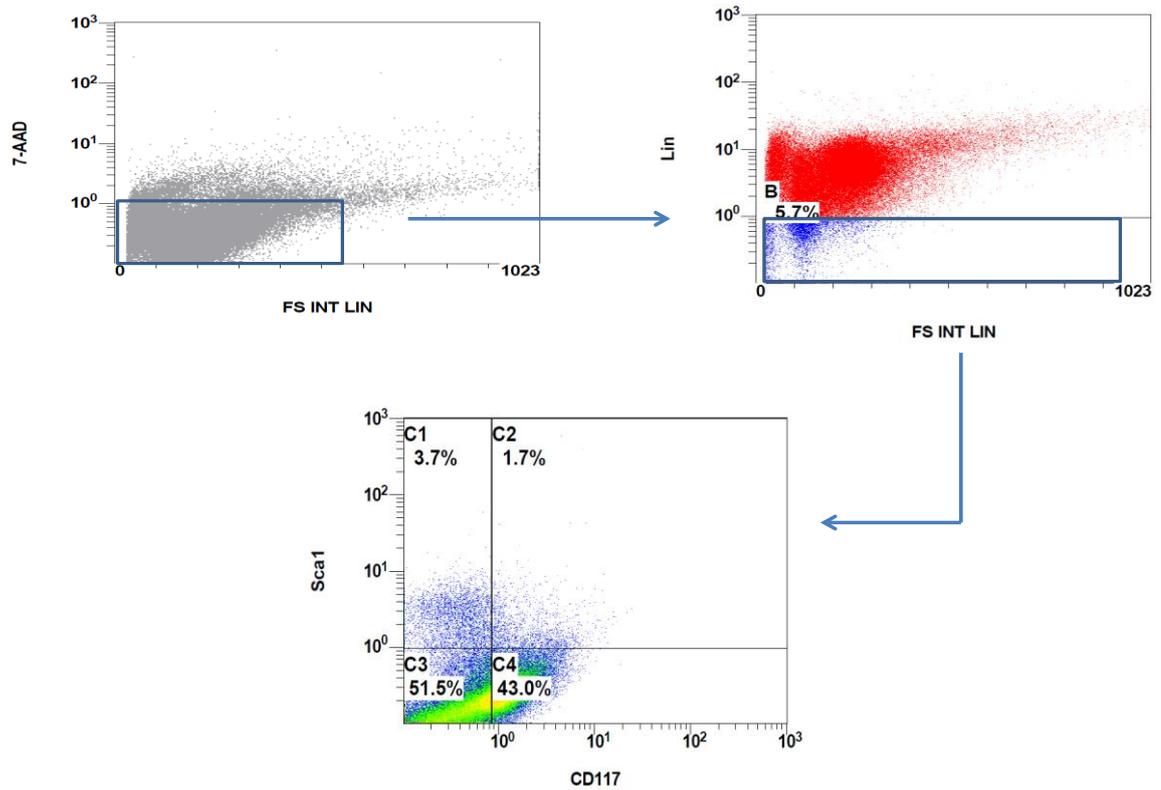


Рис. 6. Количество Sca-1+ клеток до проведения иммуномагнитной сепарации.

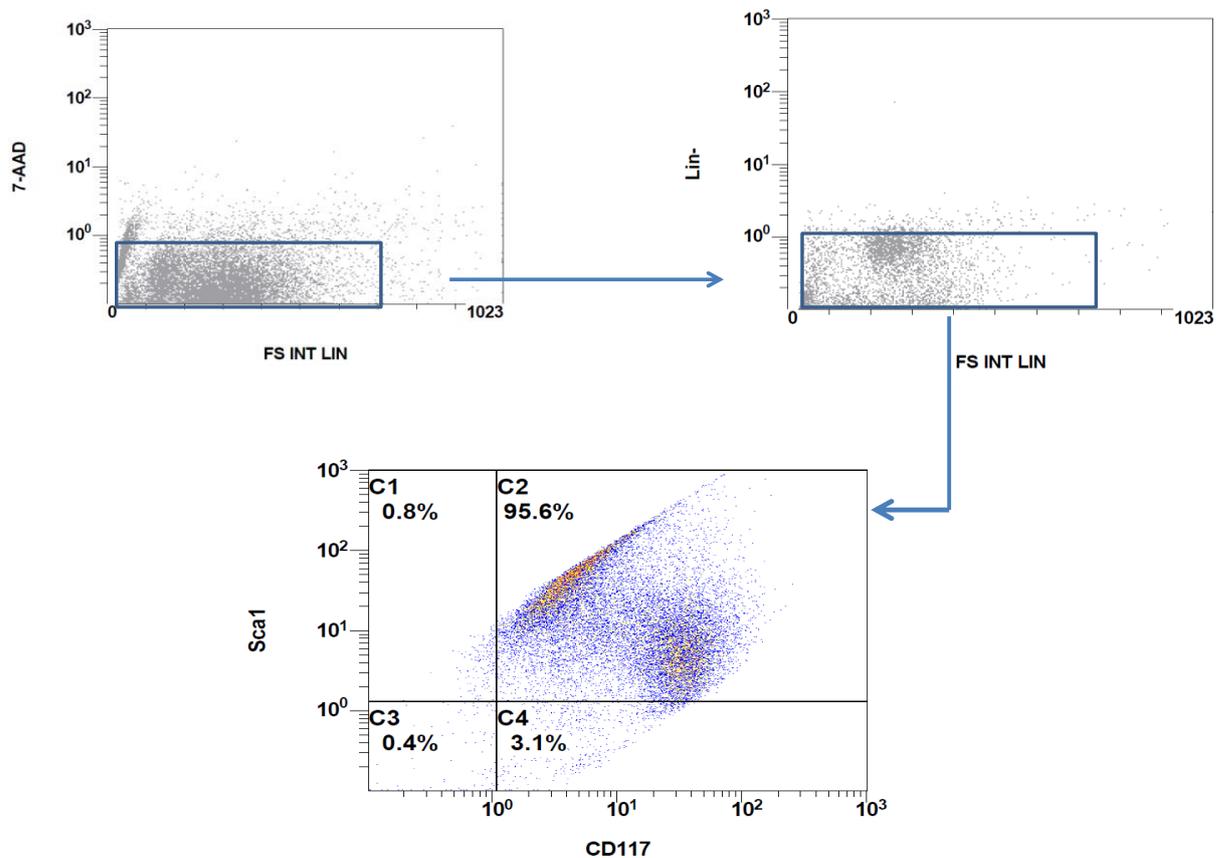


Рис. 7. Содержание CD 117 +, Sca-1+, 7-AAD-, Lin- клеток после иммуномагнитной сепарации.

2.4. Выделение и идентификация перисинусоидальных клеток печени

Мыши были наркотизированы, с использованием препарата «Золетил» (10 мг/кг). Для обеспечения доступа к воротной вене проводили срединную лапаротомию после чего отвели в сторону. После этого наложили две лигатуры: одну – выше, другую - ниже места последующего введения катера. После введения катетера в воротную вену начинали перфузию растворов ферментов. Печень перфузировали через Vena portae с помощью иглы 26G (BD, Franklin Lakes, США).

Буферные растворы предварительно нагревали до 37°C и вводили в печень через портальную вену, дренировали через нижнюю полую вену с помощью перистальтического насоса со скоростью потока 6,5 мл/мин. Последовательно вводили 3 буферных раствора.

Первый буферный раствор: солевой раствор GBSS (Sigma). Перфузию проводили в течение 4,5 минут.

Второй буферный раствор: солевой раствор GBSS (Sigma) содержащий проназу (0,264 г, Pronase E, Sigma), перфузия проводилась со скоростью 4,5 мл/мин, в течение 4,5 мин.

Третий буферный раствор: солевой р-р GBSS (Sigma), содержащий проназу (0,08 г, Pronase E, Sigma) и коллагеназу (0,16 г, Collagenase Type I, Sigma).

Перфузию проводили со скоростью 3 мл/мин, в течение 4,5 минут. Во время перфузии изменяется цвет печени – становится бледнее.

Далее печень была удалена, желчный пузырь, и соединительная ткань были отделены. Печень измельчена с помощью двух стерильных пинцетов. Суспензию клеток печени далее инкубировали в течение 20 минут на водяной бане 37 ° С в солевом растворе Гейса с добавлением 0,04 г. проназы Е, 0,048 г. коллагеназы I и 0,08 г. ДНК-азы (Sigma).

Клетки фильтровали с помощью 70-метрового нейлонового фильтра, после чего промыли в солевом р-ре Гейса (GBSS Sigma).

По градиенту плотности гистоденза (Histodenz, Sigma) проводили разделение клеток. Для этого клетки ресуспендировали в р-ре гистоденза (28,7 %), суспензию

клеток, которую получили, подслаивали к р-ру гистоденза (7%). Далее центрифугировали при 600 g 17 мин. Жиронакапливающие перисинусоидальные клетки печени оказались в верхнем слое. Клетки собрали в другую пробирку. Суспензию клеток довели до объема 15 мл с помощью раствора Гейса (GBSS Sigma) и затем центрифугировали 15 мин. при 800 g с целью отмывки от гистоденза. После удаления супернатанта клетки ресуспендировали в питательной среде (рисунок 8).

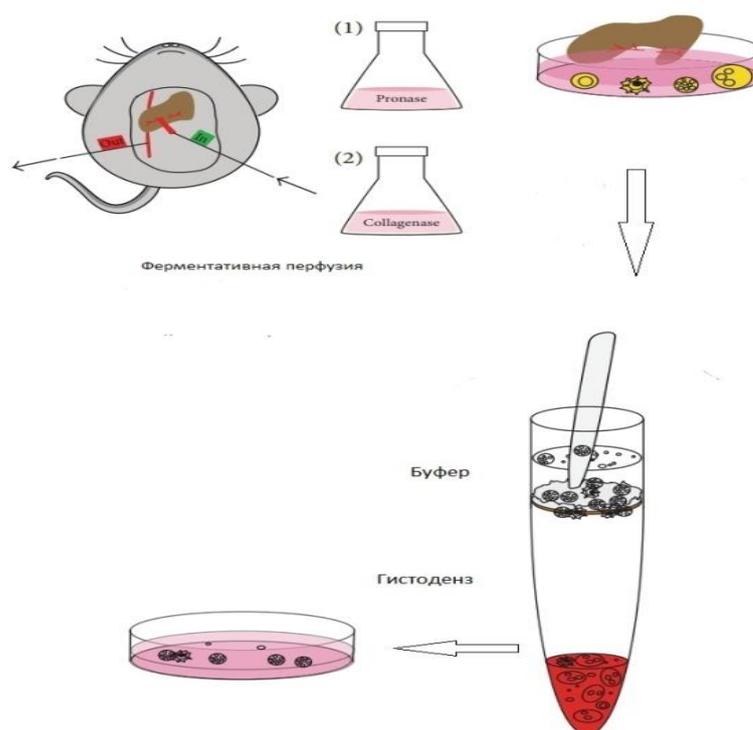


Рис. 8. Схема выделения перисинусоидальных клеток печени.

Выделенные, таким образом, клетки были использованы для дальнейшего иммуногистохимического и иммунофенотипического исследования.

Имунофенотипирование ПКП

Полученную суспензию ПКП иммунофенотипировали непосредственно после выделения методом проточной цитометрии на проточном цитометре Navios (Beckman Coulter, США) и через 14 дней культивирования. Производилась оценка эндогенной ретиноидной флуоресценции ПКП. Для этого использовали моноклональные антитела, которые конъюгированы с флуорохромами (Becton Dickinson, США).

Непосредственно после выделения ПКП характеризовались положительной флуоресценцией на ретинол и отрицательной на α -SMA – маркер миофибробластов α -гладкомышечный актин (рисунки 9, 10).

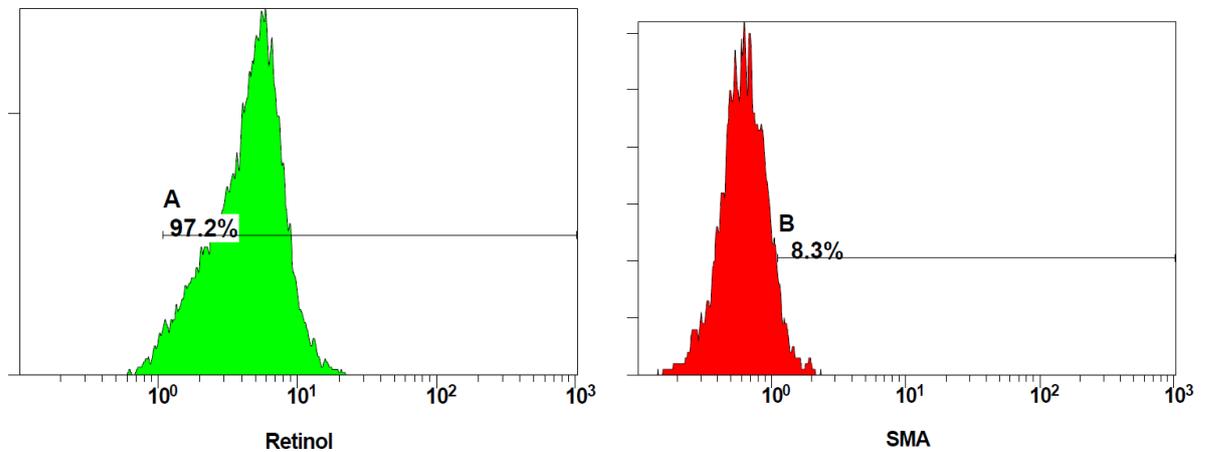


Рис. 9. Анализ ПКП на проточном цитофлуориметре до культивирования. Количество Retinol+ клеток составляет 97,2%, количество SMA+ клеток составляет 8,3%.

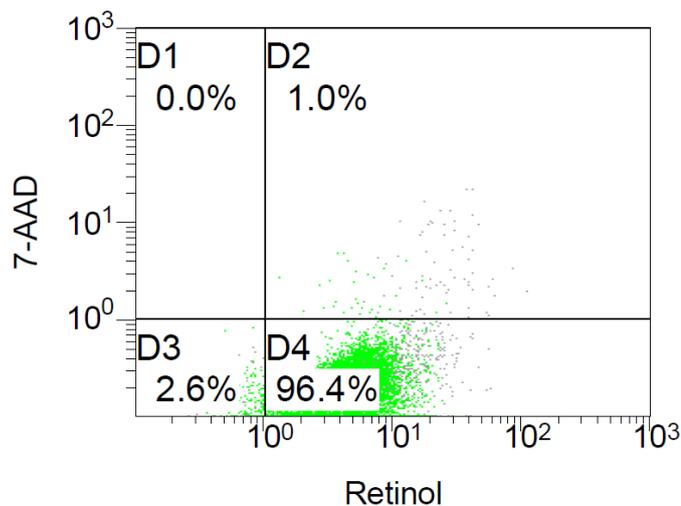


Рис. 10. Количество жизнеспособных клеток с положительной флуоресценцией на ретинол составило 96,4%.

В процессе культивирования ПКП приобретают миофибробластоподобный фенотип. Поэтому после 14 дней культивирования флуоресценция на ретинол исчезала, клетки становились позитивными по α -SMA (рисунок 11).

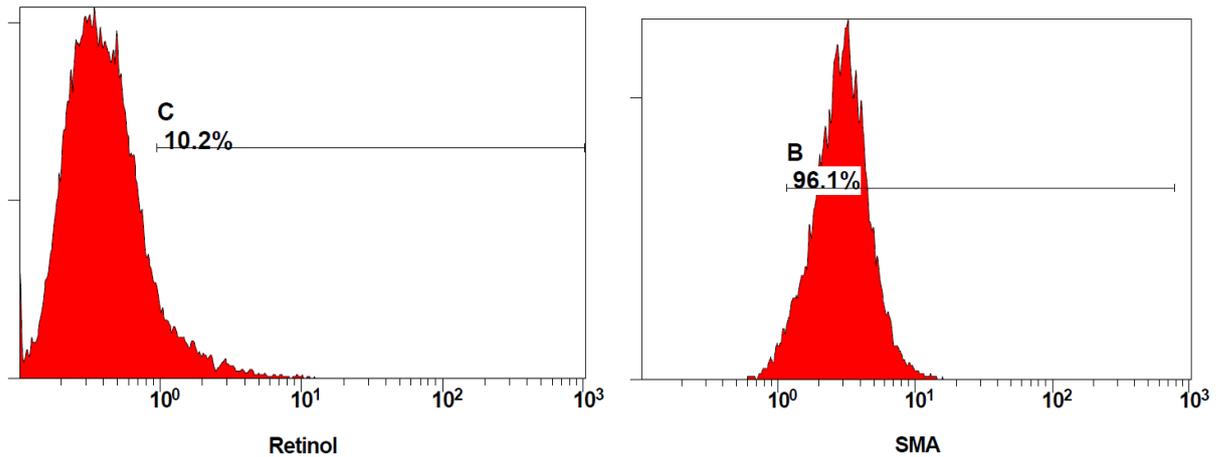


Рис 11. Анализ ПКП на проточном цитофлуориметре. 14 дней культивирования. Количество Retinol+ клеток составило 10,2%, количество SMA+ клеток составляет 96,1%.

Иммуногистохимическое окрашивание перисинусоидальных клеток печени

Для проведения иммуногистохимического окрашивания клетки культивировались в 12-ти луночном планшете.

1. Питательную среду удалили и добавили в лунку на покровное стекло 500 мкл 4 % раствора параформальдегида. Инкубировали при комнатной температуре 10 мин.

2. Промыли от параформальдегида, добавляя в лунку аккуратно по стенке, чтоб не смыть клетки 1 мл раствора PBS - 3 раза.

3. Добавили 1% раствор Triton X-100 в 0,05 М Трис-буфере (физиологический раствор, забуференный Трис-НСl буфером, рН=7,6, ТБС).

4. Промыли клетки 1X раствором ТБС.

5. Инкубировали клетки в 0,06 % растворе H_2O_2 в течение 20 мин при комнатной температуре для блокирования клеточных пероксидаз

6. Провели промывку клеток 3 раза 1X раствором ТБС.

7. Инкубировали клетки в среде с первичными антителами (100 мкл) в течение 1 часа при комнатной температуре (использовать влажную камеру, чтобы избежать высыхания клеток).

8. Промыли клетки 3 раза 1X раствором ТБС.

9. Инкубировали клетки в растворе с Post Primary Block (Novocastra) в течение 30 мин (использовать влажную камеру, чтобы избежать высыхания клеток).

10. Промыли клетки 3 раза 1X раствором ТБС.

11. Инкубировали клетки в растворе Polimer (Novocastra) в течение 30 мин при комнатной температуре

12. Промыли клетки 3 раза 1X раствором ТБС.

13. Проявили с помощью АЭК (аминоэтилкорбазол). Смешать компоненты и нанести на культуру клеток: 450 мкл ацетатного буфера, 50 мкл аминоэтилкорбазола, 15мкл 1% раствора H_2O_2 . Проявление проходит в лунке под контролем зрения под микроскопом.

14. Для окраски ядер клетки добавили раствор гематоксилина

15. Промыли проточной водой с помощью пипетки

Перисинусоидальные клетки печени характеризуются экспрессией белка промежуточных филаментов цитоскелета десмина (рисунок 12).

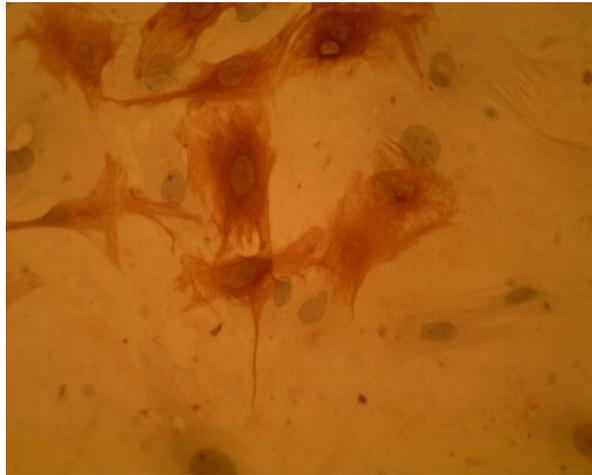


Рис 12. Культура ПКП, иммуноцитохимическое окрашивание с антителами к десмину, культивировани - 7 суток, x40.

Через неделю культивирования ПКП клеток теряют витамин А, большинство клеток формирует колонии и переходят в активную фазу, происходит их трансдифференцировка в миофибробласты. Клетки начинают экспрессировать α -ГМА, что говорит об их сократительной способности (рисунок 13). При культивировании ПКП начинают экспрессировать эпителиальные маркеры, характерные для гепатобластов (рисунки 14, 15).

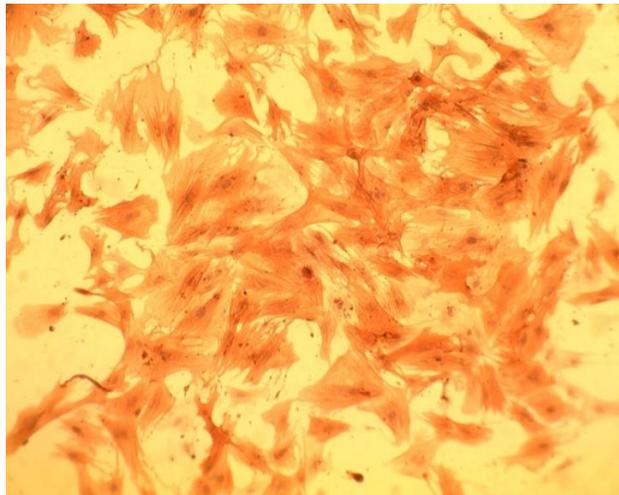


Рис. 13. ПКП на 10-е сутки культивирования, экспрессия α -ГМА, х10.



Рис. 14. ПКП на 7-е сутки культивирования, экспрессия ЦК18, х20.

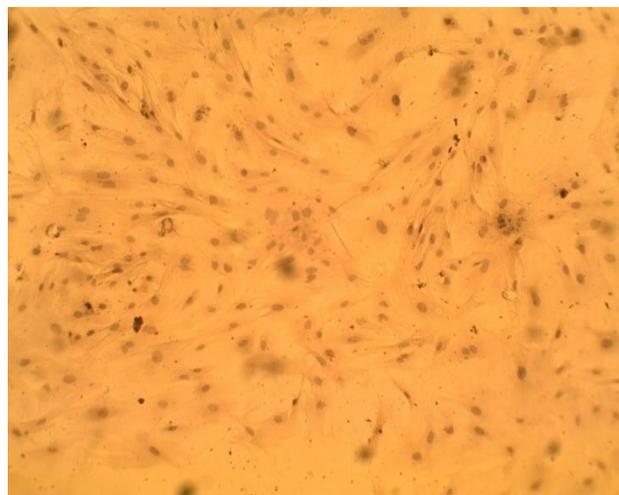


Рис 15. ПКП на 7-е сутки культивирования, экспрессия ЦК19, х10.

2.5. Экспериментальные модели повреждения печени

Частичная гепатэктомия проводилась по методу С. Mitchell и Н. Willenbring [291]. Для анестезии использовался препарат «Золетил» 10мг/кг (Virbac, Франция).

- 1) Обработали кожу 70% этанолом
- 2) Провели срединный разрез с рассечением кожи и мышц 3-4 см длиной, чтобы обнажить мечевидный отросток.
- 3) Прошили мечевидный отросток, оттянули его и зафиксировали. Мечевидный отросток приподнимается, что облегчает доступ к печени.
- 4) Наложили зажимы (рисунок 16)

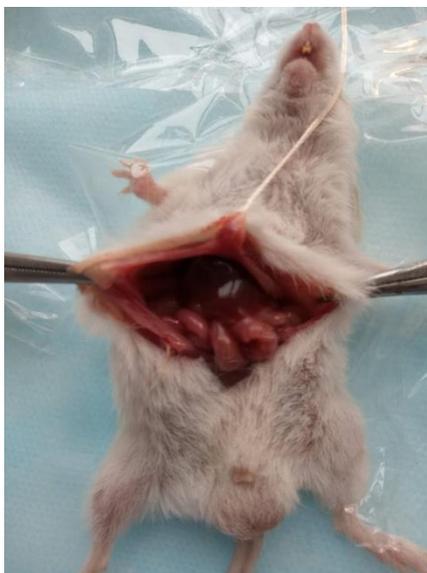


Рис 16. Приподнятие прошитого мечевидного отростка

5) аккуратно, оттягивая книзу срединную долю печени ватной палочкой, ножницами пересекли серповидную связку печени.

6) Ватной палочкой подняли срединную и левую латеральную доли и удерживали их так, чтобы они закрывали диафрагму и грудную полость. Ватной палочкой аккуратно оттянули желудок книзу и пересекли связку, которая соединяет хвостатую и левую латеральную доли.

7) Поместили шелковую нить в основание левой латеральной доли (близко к воротам печени). Ватной палочкой повернули левую боковую долю в

физиологическое положение, удерживая конец шовного материала с помощью пинцета, чтобы лигатура обошла долю.

8) С помощью иглодержателя и пинцета завязали узел поверх левой латеральной доли как можно ближе к основанию доли. Цвет доли изменился сразу, как только затянули узел, так как нарушился отток крови от доли (рисунок 17).

9) Перерезали перевязанную долю чуть выше шва. При правильной технике из культы нет кровотечения. Если есть какое-либо кровотечение из культы, значит, узел нужно затянуть сильнее.

10) Второй узел поместили выше желчного пузыря. Второй узел не должен быть затянут слишком близко к полой вене, иначе возникнет венозная обструкция, которая затруднит отток крови из оставшихся правой и хвостатой долей.

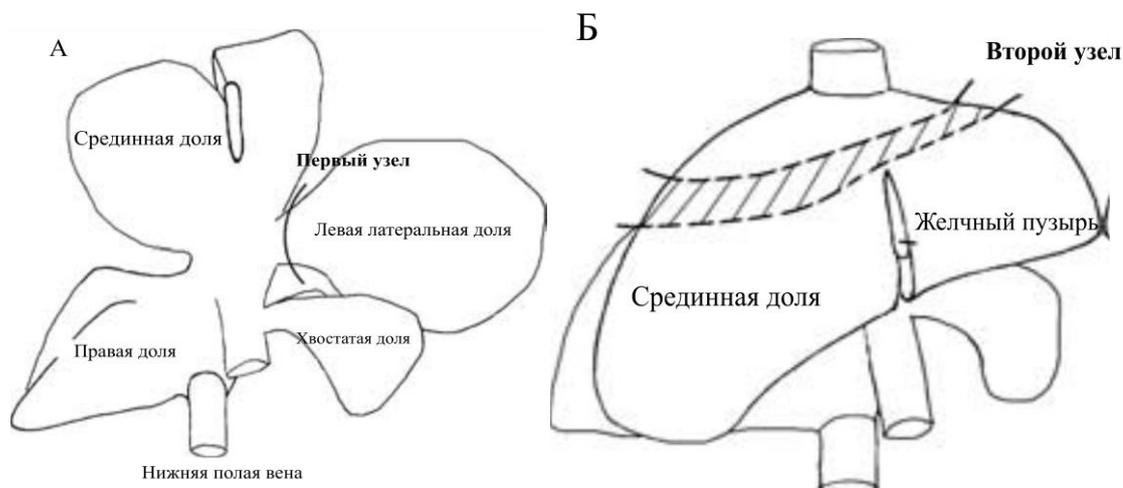


Рис 17. Схематическое изображение анатомии печени мыши и расположение нитей для узлов.

А – нить для первого узла должна быть расположена между хвостатой и левой латеральной долей у основания левой латеральной доли.

Б – Второй узел – в пределах пунктирной области, над желчным пузырем.

11. Отрезали перевязанную срединную долю над швом (рисунок 18).



Рисунок 18. Культия печени.

12. Наложили швы на брюшину и кожу.

Моделирование острого токсического повреждения печени

Острое токсическое повреждение печени моделировали путем однократного внутрибрюшинного введения четыреххлористого углерода (CCl_4) в дозе 50 мкл/мышь [71, 84, 94, 99].

На предполагаемом месте прокола предварительно выбрили шерсть и обработали 70% спиртом. Заднюю лапу мыши оттянули в сторону, после чего в нижней трети живота левее от срединной линии прокололи кожу, мускулатуру и брюшину, медленно вводили раствор.

2.6. Лабораторные методы исследования

Забор крови проводился из сердца. Далее проводили центрифугирование в течение 15 минут на 3000 g.

Изучали биохимические показатели крови на первые, третьи и седьмые сутки после введения клеток. Исследование проводили на иммуноферментном и биохимическом анализаторе Chem Well 2910 (Combi, США). Производили изучение показателей: альбумин (колориметрический метод с бромкрезоловым зеленым), общий белок (биуретовая реакция), мочевины (уреазо-салицилат-

гипохлоритный метод, реакция Бертлоа), глюкоза (глюкозоксидазный метод), общий билирубин (Метод Йендрашека-Грофа), аспартатаминотрансфераза (АСТ или АсАТ) (L-аспартат:2-оксоглутарат-аминотрансфераза, КФ 2.6.1.1.), аланинаминотрансфераза (АЛТ или АлАТ), (L-аланин:2-оксоглутарат-аминотрансфераза, КФ 2.6.1.2), щелочная фосфатаза (ЩФ, КФ 3.1.3.1.). Определение активности ферментов осуществлялось кинетическими методами. При определении биохимических показателей использовались тест-системы «Ольвекс Диагностикум», Россия.

Фибриноген определялся хронометрическим методом по Клаусу на анализаторе гемостаза АПГ2-02-П с использованием реагентов «Технология стандарт» (Россия).

2.6.1. Определение основных морфометрических показателей печени

Для анализа обзорной гистологической картины и морфометрического анализа проводили аутопсию печени. Операцию проводили под внутримышечным наркозом с использованием препарата «Золетил» 10 мг/кг (Virbac, Франция). Проводили разрез 2 см длиной по средней линии передней брюшной стенки, извлекали правую и хвостатую доли печени, проводили их иссечение.

Проводили фиксацию материала в нейтральном формалине (10%) на 0,2 М буферном растворе (рН=7,4) в течение 24 часов. После этого осуществляли обезвоживание в этаноле возрастающей концентрации и заливали в парафин. Проводили изготовление срезов 5 мкм толщиной, гистологические препараты окрашивали гематоксилином-эозином по ван Гизону.

Оценку морфометрических показателей гистологических препаратов проводили с помощью программы анализа изображений (Biovision, Россия). С помощью микроскопа (OLYMPUS BX51, Япония) проводили микрофотосъемку случайных полей зрения при разных увеличениях: $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$, $\times 600$, $\times 1000$. Исследовали не менее 10 полей зрения в каждом препарате с помощью камеры OLYMPUS XC30.

Проводилось морфологическое и морфометрическое исследование печени.

При анализе морфологической картины гистологических срезов печени при ее токсическом повреждении CCl_4 для количественной оценки воспалительных изменений производился подсчет индекса воспалительной активности (ИВА). Этот индекс был получен путем модификации существующего индекса гистологической активности, который используется для оценки выраженности фиброза в печени [238].

При этом производился анализ следующих гистологических изменений:

- 1) некрозы гепатоцитов – оценивались от 0 до 10 баллов
 - 0 баллов – отсутствуют некрозы
 - 1 балл – умеренный фокальный некроз
 - 2 – 3 балла - умеренный фокальный некроз (вовлечено менее 50% портальных трактов)
 - 4 балла – умеренный ступенчатый некроз (вовлечено более 50% портальных трактов)
 - 5 - 7 баллов - умеренный ступенчатый некроз плюс мостовидный некроз
 - 8 – 9 баллов - выраженный ступенчатый некроз плюс мостовидные некрозы
 - 10 баллов – мультилобулярный некроз
- 2) дистрофия гепатоцитов – оценивалась от 0 до 4 баллов
 - 0 баллов – отсутствуют
 - 1 - 2 балла – слабые (дистрофически измененные гепатоциты в 1/3 долек)
 - 3 балла – умеренные (вовлечены 2/3 долек)
 - 4 балла – выраженные (вовлечены более 2/3 долек)
- 3) воспалительный инфильтрат - оценивался от 0 до 4 баллов
 - 0 баллов – отсутствует
 - 1-2 балла – слабое (клетки воспалительного инфильтрата присутствуют менее чем в 1/3 долек)
 - 3 балла – умеренное (воспалительная инфильтрация в 2/3 долек)
 - 4 балла – выраженное (обильная воспалительная инфильтрация более чем в 2/3 долек)

ИВА от 1 до 3 баллов свидетельствовал о наличии «минимального» воспалительного процесса, при нарастании активности (ИВА 4 – 8 баллов) можно говорить о «слабо выраженном» воспалительном процессе. ИВА в 9-12 баллов характерен для «умеренного» воспаления, а в 13-18 баллов - для «тяжелого» воспалительного процесса.

Также производился расчет следующих морфометрических показателей:

1. Площадь гепатоцита, мкм²
2. Площадь цитоплазмы гепатоцита, мкм²
3. Площадь ядра гепатоцита, мкм²
4. Ядерно-цитоплазматический индекс (ЯЦИ)

Ядерно-цитоплазматический индекс определяли по формуле:

$$\text{ЯЦИ} = \frac{\text{Площадь ядра}}{\text{Площадь гепатоцита} - \text{площадь ядра}}$$

5. Количество гепатоцитов на 1 мм²
6. Количество двуядерных клеток, кл/мм²
7. Митотический индекс (МИ) гепатоцитов, ‰.

Митозы считали на 6000 клеток для каждого животного на гистологических препаратах печени, окрашенных гематоксилином-эозином.

8. Апоптотический индекс (АИ), выраженный в промилле.

2.6.2. Определение интенсивности апоптоза

Интенсивность апоптоза гепатоцитов определяли с помощью подсчета апоптотического индекса (АИ). Для исследования использовали набор первичных и вторичных антител по идентификации эффекторной каспазы-3 (Caspase-3) (Santa Cruz Biotech, USA) на гистологических срезах продольной ориентации.

Исследование проводили в несколько этапов:

I. Проводили депарафинизацию гистологических срезов. Для этого образец три раза погружали в ксилол и держали по 5 мин. Препарат три раза погружали в этиловый спирт (95 %) по 5 мин., после этого один раз в этиловый спирт (70 %) по

5 мин. Однократно погружали препарат в солевой буферный раствор PBS (Phosphate buffered saline) pH 7,2 (StemCell Technologies, Канада) на 5 мин.

II. Проведение подготовки образца.

Раствор Протеиназы К в концентрации 50 мкг/мл готовили непосредственно перед использованием. Для этого 1,5 мкл (5 мг/мл) протеиназы К разводили в 150 мкл буферного раствора PBS и добавляли к образцу, нанося на гистологический препарат площадью в 5 см². В течение 15 мин. инкубировали Протеиназу К с гистологическим препаратом при 18-20 °С.

Располагая вертикально, осторожно промывали гистологический образец буферным раствором PBS. После этого препарат дважды погружали в дистиллированную воду, по 2 мин каждый раз.

III. Добавили 10 %-ную козью сыворотку (Santa Cruz Biotech, США) в солевом буферном растворе PBS (Phosphate buffered saline) и инкубировали 20 минут для того, чтобы исключить неспецифическое связывание с IgG. После этого гистологический препарат на 2 мин. погрузили в буферный раствор PBS.

IV. В течение 60 мин. проводили инкубирование с первичными антителами.

Для приготовления рабочей концентрации первичных антител к каспазе-3 (Santa Cruz Biotech, USA) на каждый гистологический препарат было затрачено: 2 мкл антител к в 96,5 мкл. Раствора PBS, добавляли 1,5 мкл. 100 % козьей сыворотки (Santa Cruz Biotech, USA). После этого гистологический образец трижды погружали в буферный раствор PBS, каждый раз по 5 мин. Далее осторожно удаляли избыток жидкости с образца.

V. В течение 45 мин. инкубировали с вторичными антителами без доступа света. Для приготовления рабочей концентрации вторичных антител donkey anti-goat IgG-FITC (Santa Cruz Biotech, USA) на каждый гистологический препарат было затрачено: 1 мкл donkey anti-goat IgG-FITC в 97,5 мкл раствора PBS и 1,5 мкл 100 % ослиной сыворотки Santa Cruz Biotech, USA). После этого образец трижды погружали в буферный раствор PBS, каждый раз по 5 мин. Далее удаляли избыток жидкости с образца.

VI. Проведение визуализации.

Для визуализации ядер гепатоцитов добавили 15 мкл. красителя DAPI. Поверх гистологического препарата зафиксировали покровное стекло, для фиксации использовали среду Biomount (BD Biosciences, США).

Для визуализации использовали длины волн 365 нм и 470 нм соответственно для флуорохромов DAPI и FITC. Анализировали выраженность апоптоза гепатоцито при помощи флуоресцентного микроскопа Carl zeiss (Германия), увеличение x 400 (рисунок 19).

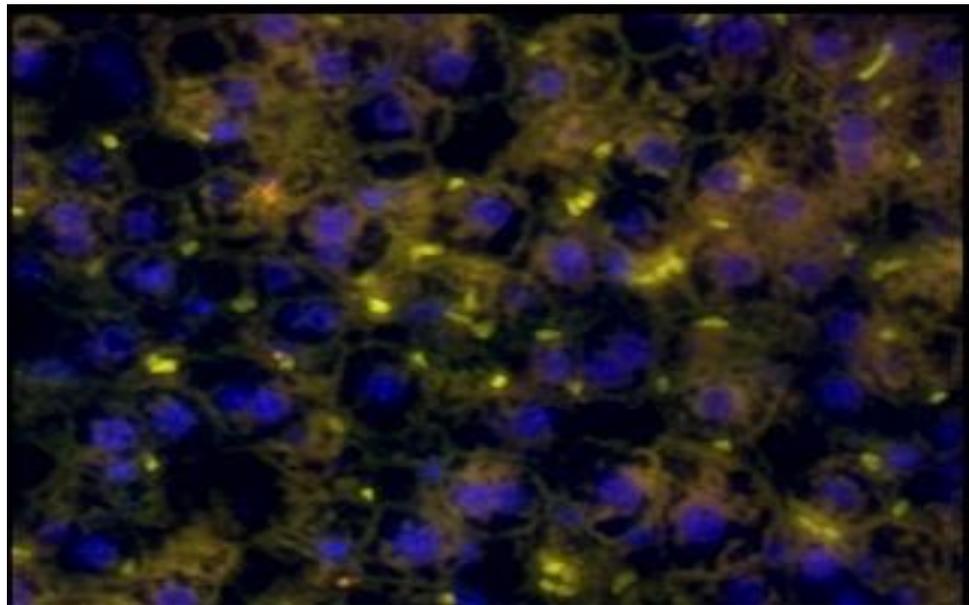


Рис. 19. Увеличение x 400. Флуорохромы FITC и DAPI.

Интенсивность апоптоза гепатоцитов определяли с помощью формулы для подсчета апоптотического индекса:

$$AI = \frac{\text{Количество гепатоцитов в состоянии апоптоза}}{1000 \text{ подсчитанных гепатоцитов}} * 1000 \%$$

2.6.3. Микроядерный тест

Постановка микроядерного теста проводилась по методу Колмаковой Т.С. [49]. Кусочки печени фиксировали в формалине. Срок фиксации не менее 1 месяца при температуре + 4 градуса. Использовали 10% нейтральный раствор формальдегида на фосфатном буфере 1/10 М рН 7,0.

Приготовление буферного раствора:

Раствор А: 1/10 М KH_2PO_4 – 13,6 г/л

Раствор Б: 1/10 М $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ – 35,8 г/л

Растворы А и Б хранили в холодильнике плотно закупоренными, перед употреблением смешивали 390 мл раствора А и 160 мл раствора Б.

Для обеспечения равномерного распределения клеток в препарате важна подготовка предметных стекол. При соблюдении обезжиривания и желатинизации стекол клетки в момент подсыхания суспензии на стекле собираются в плотные тяжи. Предметные стекла промыли в водопроводной воде, дважды промыли дистиллированной водой. Высушили на воздухе. Каждое стекло погрузили в раствор желатина (50 мг на 25 мл дистиллированной воды), высушили. Стекла, имеющие несмачивающиеся участки поверхности, отбраковывали и подвергали повторно всем процедурам обработки.

Подготовка клеток

1. Отделили лезвием бритвы от кусочка фиксированной ткани печени пласт толщиной до 0,5 мм. Промыли в проточной водопроводной воде в течение 7- часов.

2. Промокнули кусочки фильтровальной бумагой, поместили в центрифужные пробирки, залили 1,5 мл 50 %-го раствора КОН из холодильника. Выдержали 16 часов при 20°C. Соблюдение указанного температурного режима важно для сохранения целостности клеток.

3. Слили щелочь, оставив одну каплю, опрокинув пробирку, легким постукиванием переместили кусочек печени к краю пробирки. Сухой стеклянной палочкой осторожными движениями вертикально к стенке пробирки размяли до состояния мелких крупинок.

4. Осторожно залили 7 мл дистиллированной воды, выдержали в холодильнике (при +4°C) до полного оседания суспензии.

5. Пипеткой удалили воду, залили клетки 7 мл фосфатного буфера, выдержали в холодильнике до полного оседания клеток.

6. После удаления буферного раствора дважды промыли дистиллированной водой, каждый раз давая клеткам осесть в холодильнике. Недостаточно тщательное отмывание буферного раствора приводит к сморщиванию клеток при подсыхании нанесенной на предметное стекло суспензии.

7. Пипеткой удалили воду, несколько капель густой суспензии клеток перенесли на стекло. Добавили каплями дистиллированную воду, осторожно пипетировали. Густоту суспензии контролировали на пробном препарате под микроскопом. Препарат просушили на воздухе.

Проведение окраски препаратов

1. Препарат поместили в свежеприготовленную смесь абсолютного этанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3/1 на 10 минут. На воздухе препарат просушили.

2. Добавили свежееотфильтрованный 2,5%-ным ацетоорсеин и инкубировали в течение одного часа для прокрашивания препарата. В двух сменах 45% раствора уксусной кислоты промыли препарат, каждый раз по 4 минуты. Ополоснули дистиллированной воде, после чего просушили на воздухе.

3. Препарат на 3 минуты погрузили в раствор светлого зеленого. В двух сменах дистиллированной воды промыли препарат, каждый раз по 5 минут. Просушили на воздухе.

Микроскопировали в проходящем свете под объективом с масляной иммерсией с матовым фильтром. Анализировали паренхимные клетки, учитывали клетки с микроядрами.

Показателем качества препарата является отсутствие свободнолежащих ядер гепатоцитов или клеток с рваными негладкими границами. Все клетки лежат отдельно, хорошо расправлены. Ядра пурпурно-красные, цитоплазма голубая. Критерием паренхимных клеток является относительно крупный размер и

характерная полигональная форма, а также округлое крупное ядро. Микроядра – округлые хроматиновые тельца, не приломляют свет, имеют диаметр в среднем около 1,5 мкм или 14 % от диаметра ядра гепатоцита. В 98 % случаев диаметр микроядер находится в пределах до 30 % от диаметра ядра. Примерно 1/3 микроядер представлена гомогенными оптически плотными образованиями, напоминающими фрагмент хромосомы в анафазе. Около 2/3 от всех микроядер имеют диффузный сетчатый рисунок хроматина, подобно ядру печеночной клетки. У интактных мышей встречается от 1 до 10 гепатоцитов с микроядрами на 1000, в среднем около 4 ‰.

2.6.4. Определение активности Поли(АДФ-рибоза) полимеразы (PARP)

Оценка уровня Поли-АДФ-рибозилирования осуществлялась по методу Kunzmann A., Lui D, Annett K в клетках печени с использованием первичных (Anti-Poly (ADP-Ribose) Polymer antibody, abcam) и вторичных антител (Rabbit Anti-Chicken IgY H&L (FITC)) методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитометре Beckman Coulter [161].

Для анализа была использована суспензия клеток печени, полученная путем проназно-коллагеназной перфузии. С помощью проточной цитофлуориметрии оценивали содержание Поли(АДФ-Рибоза)полимера согласно следующей методике.

1. Собрали клетки в концентрации 2×10^6 в мл в растворе PBS.
2. Фиксировали клетки в 0,01% растворе формальдегида в течение 15 мин при комнатной температуре.
3. Пермеабелизировали клетки с помощью 1% раствора тритона в PBS.
4. К 100 мкл клеточной суспензии добавили 2 мкл первичных антител (Anti-Poly (ADP-Ribose) Polymer antibody, Abcam)
5. В течение 30 мин инкубировали при температуре 18-20°C.
6. В течение 5 минут центрифугировали при 400 g и ресуспендировали в PBS.
7. Добавили 1 мкл вторичных антител (меченных флуоресцентной меткой FITC) (Anti-Poly (ADP-Ribose) Polymer antibody, Abcam)

8. Инкубировали в темноте в течение 30 мин. при комнатной температуре

9. Проводили анализ на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США).

Моноклональные антитела специфически взаимодействуют с дискретными антигенными детерминантами, экспрессированными внутри клетки. Выраженность флюоресценции от каждой клетки зависит от количества меченых моноклональных антител, которые связались со специфическими антигенами внутри клетки. Таким образом, среднюю интенсивность флюоресценции клеток (MFI), можно использовать как количественный критерий, который характеризует экспрессию антигенов (плотность рецепторов) внутри клетки (рисунки 20, 21, 22).

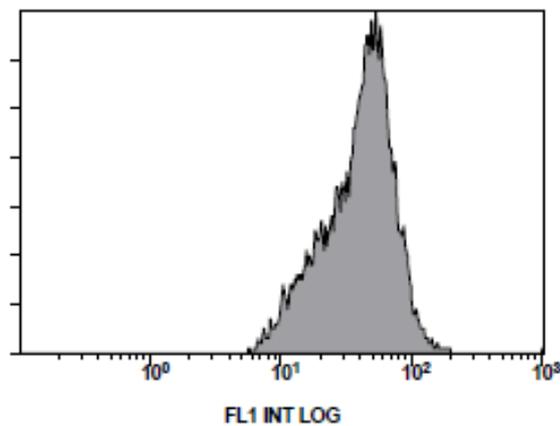


Рис. 20. Уровень Поли (АДФ-рибоза)-полимера в клетках печени зрелых лабораторных животных в физиологических условиях. MFI = 45,2

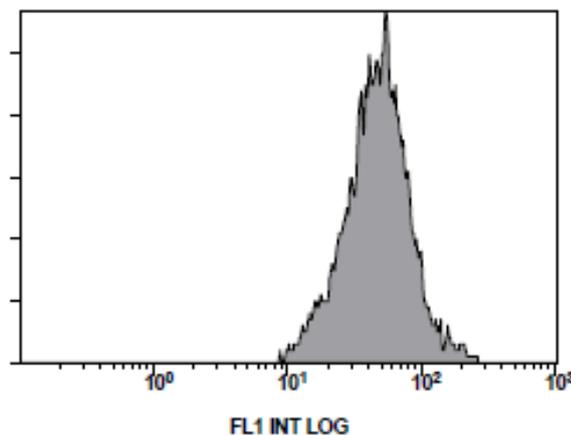


Рис. 21. Уровень Поли (АДФ-рибоза)-полимера в клетках печени зрелых лабораторных животных на 7 сутки после частичной гепатэтомии. MFI = 59,3

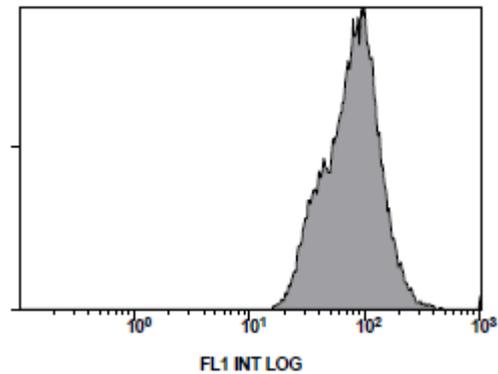


Рис. 22. Уровень Поли(АДФ-рибоза)-полимера в клетках печени зрелых лабораторных животных на 7 сутки после введения CCl_4 . MFI = 91,3

Сдвиг вправо (FL-1; ось x) указывает на повышенный уровень Поли(АДФ-рибоза)-полимера.

2.7. Определение уровня фактора роста гепатоцитов (HGF) в сыворотке крови

С помощью набора HGF Mouse ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (Abcam) методом иммуноферментного анализа осуществлялось количественное измерение HGF в сыворотке крови (эксперименты проведены совместно с Максимовой А.Ю. в биохимической лаборатории ЦНИЛ ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России).

В основе анализа по определению фактора роста гепатоцитов лежит использование специфических антител для HGF мыши. Стандарты и образцы пипеткой добавляли в лунки, и HGF, присутствующий в образце, связывался с иммобилизованным антителом. Лунки промывали и добавляли биотинилированное анти-мышинное антитело HGF. После вымывания несвязанного биотинилированного антитела в лунки добавляли стрептавидин. После этого лунки промывали и добавляли раствор субстрата ТМВ. Происходило изменение цвета пропорционально количеству связанного HGF. Стоп-раствор менял цвет с синего на желтый, а интенсивность цвета измерялась при 450 Нм. С помощью набора стандартов строили калибровочный график со стандартной концентрацией на оси X и оптической плотностью на оси Y. С помощью

калибровочной кривой производили расчет концентрации HGF в опытных образцах.

2.8. Оценка предтрансплантационной безопасности ММСК, ГСК и ПКП

Для оценки предтрансплантационной безопасности вводимых ММСК, ГСК и ПКП использовали набор Cell Transformation Detection Assay (Sigma-Aldrich, США).

В процессе исследования были выделены опытные лунки, а также лунки, которые являлись позитивным и негативным контролем.

Опытные лунки:

1. ММСК третьего пассажа, выделенные из плаценты, культивировались в специализированной среде для культивирования. К данной культуре клеток был добавлен промотор (12-О-тетрадеcanoилфорбол 13-ацетата).

2. ПКП, которые выделяли из печени путем коллагеназно-проназной перфузии с дальнейшим разделением клеток по градиенту плотности гистоденза. К данной культуре клеток был добавлен промотор (12-О-тетрадеcanoилфорбол 13-ацетата).

3. ГСК, полученные из плаценты методом иммуномагнитной сепарации. Культивировались с ММСК в специализированной среде для культивирования. К данной культуре клеток был добавлен промотор (12-О-тетрадеcanoилфорбол 13-ацетата).

В состав специализированной среды входит MesenCult MSC Basal Medium Mouse («StemCell Technologies», Канада) и MesenCult™ Proliferation Supplements Mouse («StemCell Technologies», Канада) в соотношении 4 : 1.

В качестве позитивного контроля использовали культуру клеток (ММСК, ГСК, ПКП), в которую был добавлен канцероген (N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина) и промотор (12-О-тетрадеcanoилфорбол 13-ацетата).

Негативный контроль: культура клеток (ММСК, ГСК, ПКП) без канцерогена и без промотора.

1 этап. Подготовка позитивного контроля.

1) В культуру клеток добавили 500 нг/мл N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина (MNNG) и культивировали в течение 72 часов.

2) Удалили MNNG-содержащие среды и культивировали клетки в течение 3 дней в нормальных питательных средах без добавок.

3) с целью реализации второго этапа канцерогенеза к культуре клеток был добавлен промотор 12-O-тетрадеканойлфорбол 13-ацетата (ТФА).

Культивирование клеток в течение еще 2 недель в питательной среде, содержащей 100 нг / мл ТФА.

4) Далее культивировали клетки еще одну неделю в питательных средах, без каких-либо добавок.

II этап. Культивирование культур клеток в опытных, позитивных и негативных лунках осуществлялось в 0,4% растворе агара.

1) Был приготовлен 0,4 % раствор агара и помещен в лунки 24-х луночного планшета («Nunc», Германия).

Известно, что ММСК, ПКП обладают способностью к адгезии и пролиферации на твердой поверхности (культуральный пластик). Нетрансформированные ММСК и ПКП не способны формировать колонии на мягкой подложке (0,4 % агар).

2) На лунку площадью 1,9 см² было высеяно $1 \cdot 10^4$ клеток.

3) Инкубировали клетки в течение 21 дня при 37°C с 5% CO₂ до образования колоний.

4) Каждые 3 суток производилась смена питательной среды.

5) Через 21 день производилась оценка полученных культур.

6) К культурам клеток добавили 0,5 мл окрашивающего раствора (состав раствора производитель не раскрывает, Cell Stain Solution, Sigma-Aldrich, США).

7) В течение 10 ч клетки инкубировали в условиях CO₂ инкубатора.

8) Оценка полученных колоний производилась с использованием микроскопа Carl ZEISS (Primo Star, Германия).

В лунках с положительным контролем обнаружено формирование колоний клеток (рисунок 24). При этом в лунках с отрицательным контролем и в опытных лунках колонии клеток обнаружены не были (рисунки 23, 25, 26, 27)

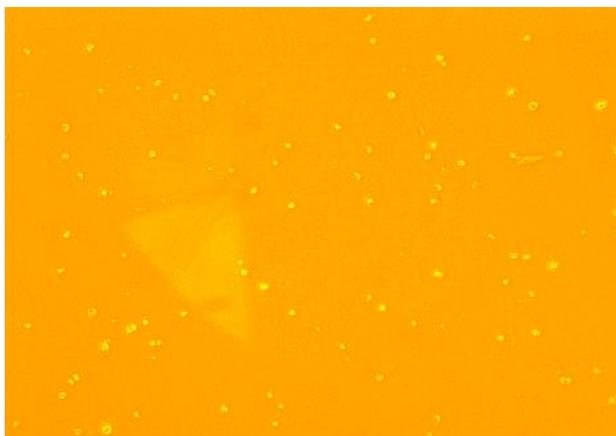


Рис. 23. Отрицательный контроль. 21 сутки культивирования

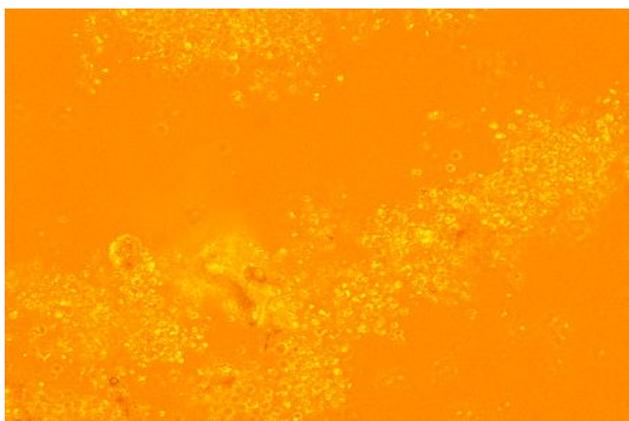


Рис. 24. Положительный контроль. 21 сутки культивирования.

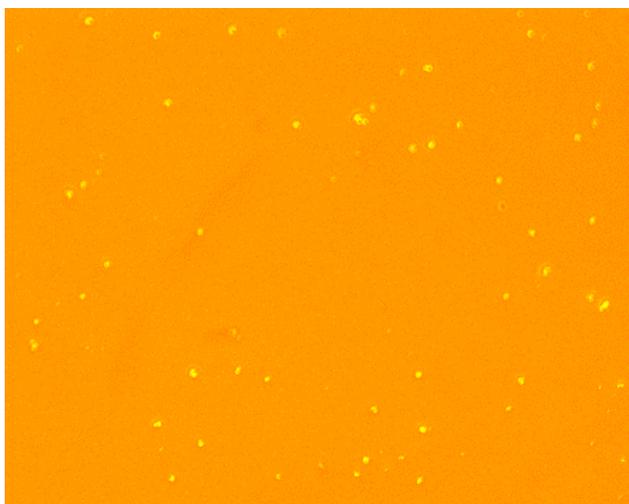


Рис. 25. Опытная культура клеток ММСК 3 пассажа 21 сутки культивирования.

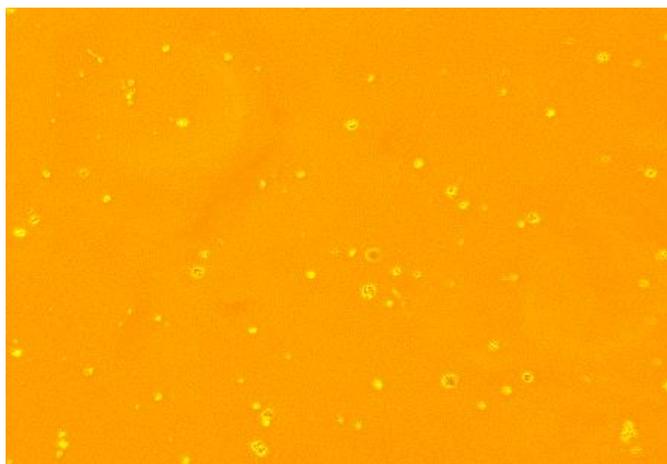


Рис. 26. Опытная культура клеток ГСК с ММСК в качестве питательной подложки 21 сутки культивирования.

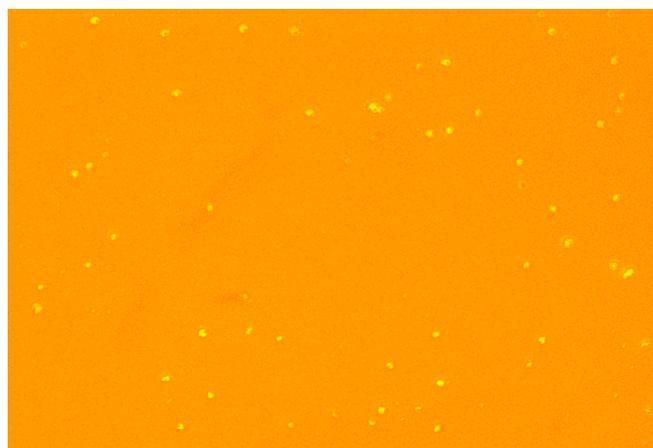


Рис. 27. Опытная культура ПКП 21 сутки культивирования.

Производилась спектрофотометрическая оценка оптической плотности питательной среды опытных и контрольных культур клеток.

Спектрофотометрии проводилась на планшетном спектрофотометре (Spectrostar Nano, США) OD 490. Установлено повышение уровня оптической плотности питательной среды в культуре, которая являлась положительным контролем. Это говорит о том, что в культуре, которая являлась положительным контролем, произошла опухолевая трансформация клеток. В культуре, которая являлась отрицательным контролем, и в каждой из опытных культур клеток не выявлено повышения уровня оптической плотности, что свидетельствует об отсутствии опухолевой трансформации клеток (рисунки 28, 29, 30).

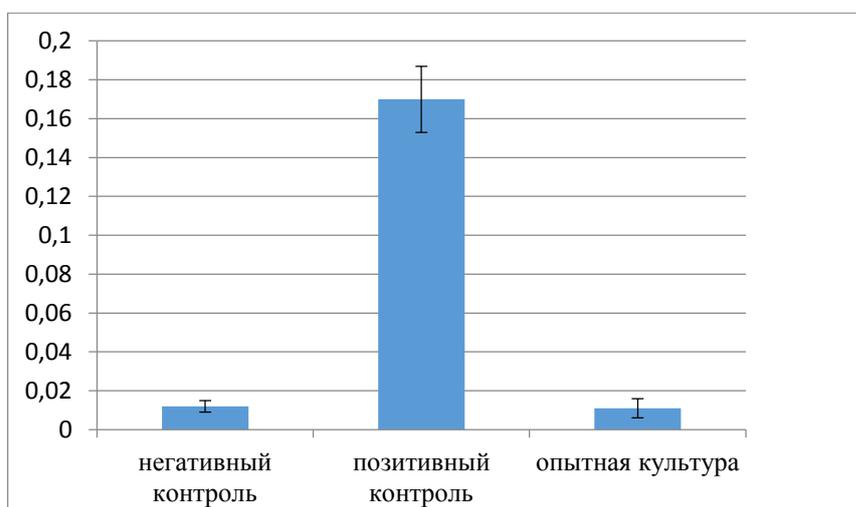


Рис 28. Спектрофотометический анализ культуры ММСК третьего пассажира

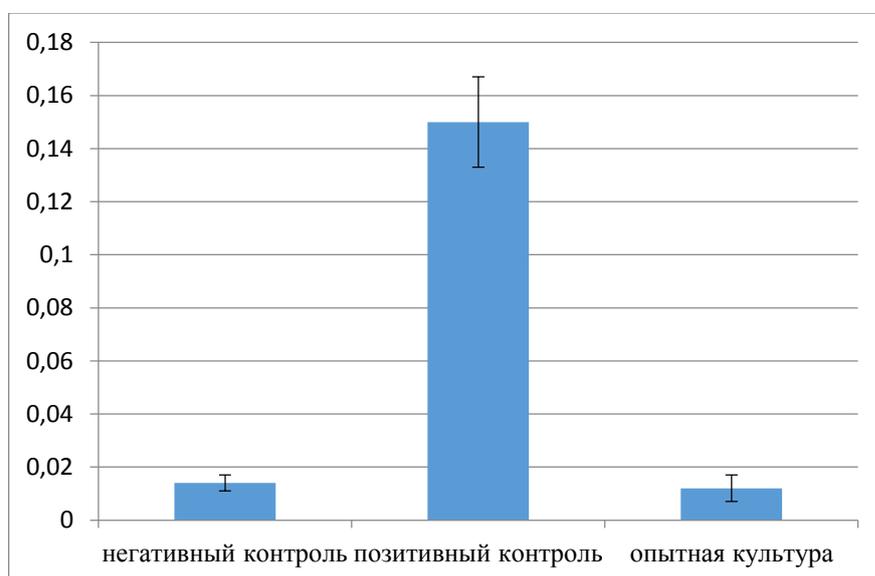


Рис 29. Спектрофотометический анализ культуры ГСК

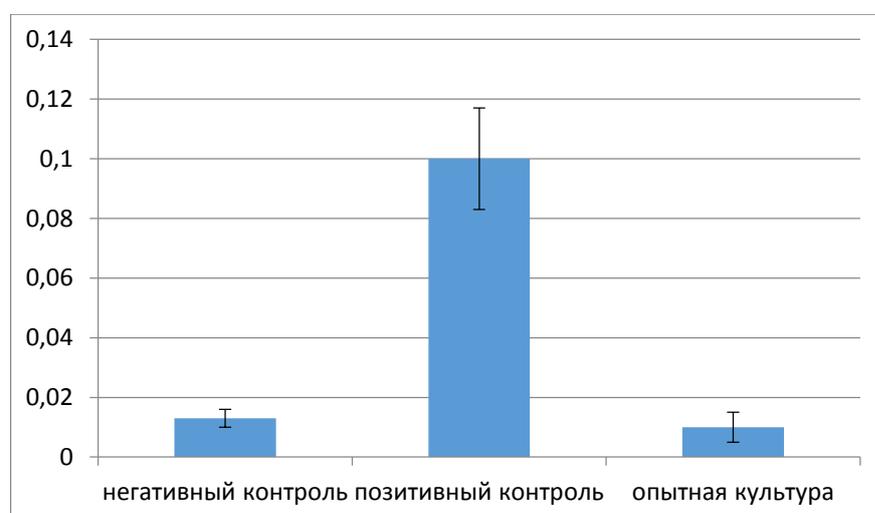


Рис. 30. Спектрофотометический анализ культуры ПКП : 1 – отрицательный контроль, 2 – положительный контроль, 3 опытная культура ПКП

2.9. Исследование хоуминга клеток

Для изучения хоуминга клеток осуществляли мечение клеток с помощью двух красителей. ММСК метили акридиновым оранжевым, ГСК и ПКП окрашивали CFDA SE (5-(and 6)-Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) (Stem Cell Technologies, Канада).

Приготовление раствора акридинового оранжевого для оценки хоуминга ММСК

Раствор акридинового оранжевого развели физиологическим раствором. Для этого к раствору акридинового оранжевого (1%, 50 мкл) добавили 2,5 мл 0,9% раствора NaCl. К суспензии клеток добавили полученный 0,02 % раствор акридинового оранжевого в соотношении 1:1. В течение 20 минут инкубировали в темноте. Затем клетки центрифугировали при 1000 g в течение 15 мин для отмывки от акридинового оранжевого.

Приготовление раствора CFDA SE (5-(and 6)-Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) для оценки хоуминга ГСК и ПКП

CFDA-SE(5 (6)-карбоксифлуоресцеин диацетат сукцинимидиловый эфир) является стабильным, проницаемым для клеток предшественником диацетата CFDA-SE. При диффузии в клетку внутриклеточные эстеразы расщепляют ацетатную группу с образованием CFSE, который взаимодействует с клеточными аминами через свои сукцинимидильные группы с образованием высоко флуоресцентного зеленого красителя, непроницаемого для клеточной мембраны.

Методика окрашивания клеток:

1. Приготовить Первичный раствор CFDA-SE: 1 флакон, содержащий лиофилизированный краситель CFDA-SE был разведен в 36 мкл ДМСО для приготовления 5 mM раствора.
2. Для приготовления рабочего раствора CFDA-SE к 1 мкл 5 mM Первичного раствора было добавлено 1 мл PBS.

3. Клетки были суспендированы в рабочем растворе CFDA-SE в концентрации 10 млн. кл./мл

4. Инкубировали в течение 20 мин при 37°C в темноте.

5. Была добавлена специализированная питательная среда в пятикратном объеме, клетки были ресуспендированы и инкубированы в течение 10 мин.

6. Центрифугирование клеток, добавление PBS с целью получить необходимую концентрацию клеток.

Эксперименты по изучению хоуминга клеток были проведены на крысах, что связано с технической сложностью введения клеток в портальную вену, печеночную артерию у мышей. Частичную гепатэктомию у крыс выполняли по методике G.M. Higgins, R.M. Anderson. Трансплантацию клеток осуществляли непосредственно после частичной гепатэктомии. Введение ММСК, окрашенных акридиновым оранжевым, выполняли разными способами: в хвостовую латеральную вену, интраперитонеально, в печеночную артерию, в портальную вену в дозе 4 млн.кл/кг. массы тела. Через 24 часа оценивали количество клеток, оказавшихся в печени.

Получение суспензии клеток органов

В стерильном солевом буферном р-ре pH 7,2 - Dulbecco's phosphate buffered saline (StemCell Technologies, США) промывали образец ткани. После этого к образцу ткани добавляли раствор фермента - Аккутаза (Millipore, США) - 3,8 мл фермента на чашку Петри диаметром 6 см. Производитель утверждает, что раствор аккутазы способствует ферментативному разрушению межклеточных контактов, при этом не вызывает повреждения мембраны клеток. Тщательно измельчали ткань органа с помощью ножниц. Проводили инкубирование суспензии клеток на шейкере при температуре 37°C 7 мин. После этого профильтровали полученную суспензию для удаления дебриса, использовали фильтры с размером пор 70 мкм (Millipore, США). Очень аккуратно, предотвращая смешивания нанесли суспензию клеток на раствор лимфолайт-М (StemCell Technologies, США) в соотношении 1:2 для получения моноклеарной

фракции. Центрифугировали 20 мин. при 1000 g. После центрифугирования моноклеарная фракция клеток отделилась от других клеток и была видна в пробирке в виде «пояска». Аккуратно забрали нужную фракцию клеток. Центрифугировали полученные клетки 10 мин при 300 g для отмывки полученной суспензии клеток лимфоцитами-M. Суспендировали осадок в солевом буферном растворе PBS. Провели подсчет общего количества клеток в камере Горяева (световая микроскопия) и клеток, окрашенных акридиновым оранжевым (флуоресцентная микроскопия). Определили соотношение окрашенных клеток к их общему количеству.

2.10. Получение клеточного лизата

Для выяснения механизмов полученных эффектов от введения клеток были дополнительно проведены исследования по изучению морфофункционального состояния печени после введения клеточных лизатов. Клеточный лизат - это бесклеточный экстракт, образовавшийся после разрушения клеток ферментативным путем. Получали клеточный лизат ММСК, ГСК, ПКП с помощью лизирующего буфера (Cell Extraction Buffer, Abcam, Великобритания).

2.11. Методы статистической обработки

Статистический анализ проводили с помощью программного пакета SPSS Statistics (версия 17.0) полученные данные представляли в виде среднего арифметического значения (M) и стандартной ошибки среднего (SD). Нормальность распределения значений выборок анализировали с использованием теста Шапиро-Уилка. При условии нормального распределения различия показателей групп оценивали проводили по Т-критерию Стьюдента с учетом поправки Бонферони, в противном случае - по U-критерию Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. ИЗМЕНЕНИЕ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ПЕЧЕНИ ЖИВОТНЫХ РАЗНОГО ВОЗРАСТА ПОД ВЛИЯНИЕМ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ И ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ ПЕЧЕНИ

3.1. Изучение хоуминга трансплантированных клеток в физиологических условиях и в условиях повреждения печени

С целью определения оптимального пути введения клеток для активации регенерации печени были проведены исследования по изучению миграции трансплантированных клеток (ММСК, ГСК, ПКП) у зрелых и старых лабораторных животных в физиологических условиях и в условиях повреждения печени, вызванного частичной гепатэктомией и введением четыреххлористого углерода. Введение клеток осуществлялось в хвостовую вену, интраперитонеально, в печеночную артерию, в портальную вену.

Производилась оценка направленного движения клеток в трех ситуациях:

1. Введение ММСК в количестве 120 тыс. кл/мышь.
2. Сочетанное введение ММСК в количестве 120 тыс. кл/мышь и ГСК в количестве 10 тыс. кл/мышь
3. Котрансплантация ММСК в количестве 120 тыс. кл/мышь и ПКП в количестве 270 тыс. кл/мышь. Изучение распределения клеток проводилось через 1 сутки. Для исследования направленного движения клеток ММСК обрабатывали акридиновым оранжевым, ГСК и ПКП были обработаны CFSE.

Анализ количества меченых клеток в печени производился через 24 часа после введения клеток.

В результате исследования получено, что у животных без повреждения печени через 24 ч после введения окрашенных акридин оранжевым ММСК в хвостовую вену, портальную вену, печеночную артерию количество обнаруженных меченых клеток в печени достоверно не отличалось. При внутрибрюшинном способе введения содержание меченых клеток в печени было

достоверно меньше относительно количества клеток в печени при других изучаемых способах введения (таблица 2).

Таблица 2. Количество ММСК, обнаруженных в печени, при разных путях введения

Путь введения	% от введенных клеток	
	Зрелые	Старые
В хвостовую вену	0,91±0,086	0,80±0,078
v. portae	0,87±0,075	0,82±0,088
a. hepatica	0,93±0,090	0,86±0,085
внутрибрюшинно	0,32±0,033*	0,25±0,028°

Примечание:

* отличие от показателей содержания меченых клеток в печени у зрелых лабораторных животных при разных способах введения, достоверно с $p < 0,05$;

° отличие от показателей содержания меченых клеток в печени у старых лабораторных животных при разных способах введения, достоверно с $p < 0,05$

При проведении сочетанной трансплантации ММСК и ГСК выявлено, что количество обнаруженных клеток в печени при введении клеток в хвостовую вену, в печеночную артерию, портальную вену не отличается. При внутрибрюшинном способе введения количество обнаруженных меченых клеток (ММСК и ГСК) в печени было существенно меньше (таблица 3).

Таблица 3

Количество обнаруженных меченых клеток в печени при разных путях введения

Путь введения	% от введенных клеток			
	Зрелые		Старые	
	ММСК	ГСК	ММСК	ГСК
В хвостовую вену	0,88±0,085	0,85±0,086	0,83±0,080	0,82±0,085
v.portae	0,93±0,088	0,90±0,077	0,80±0,085	0,78±0,089
a.hepatica	0,94±0,091	0,88±0,083	0,76±0,089	0,81±0,085
внутрибрюшинно	0,30±0,026*	0,28±0,029	0,21±0,020°	0,23±0,025°

Примечание:

* отличие от показателей содержания клеток в печени у зрелых лабораторных животных при разных способах введения, достоверно с $p < 0,05$;

° отличие от показателей содержания клеток в печени у старых лабораторных животных при разных способах введения, достоверно с $p < 0,05$

При анализе распределения меченых клеток после сочетанной трансплантации ММСК и ПКП выявлено отсутствие достоверных отличий в распределении клеток, введенных в хвостовую вену, портальную вену, печеночную артерию. По сравнению с этими способами введения при внутрибрюшинном пути введения в печени оказалось существенно меньше клеток (таблица 4).

Таблица 4

Количество обнаруженных ММСК и ПКП в печени при разных путях введения

Путь введения	% от введенных клеток			
	Зрелые		Старые	
	ММСК	ПКП	ММСК	ПКП
В хвостовую вену	0,88±0,086	0,86±0,079	0,84±0,085	0,85±0,080
v.portae	0,92±0,090	0,85±0,081	0,80±0,087	0,82±0,077
a.hepatica	0,85±0,086	0,89±0,084	0,83±0,082	0,84±0,081
Внутрибрюшинно	0,33±0,034*	0,35±0,036*	0,24±0,021°	0,22±0,020°

Примечание:

* отличие от показателей содержания клеток в печени у зрелых лабораторных животных при разных способах введения, достоверно с $p < 0,05$;

° отличие от показателей содержания клеток в печени у старых лабораторных животных при разных способах введения, достоверно с $p < 0,05$

Определение меченых клеток в печени при разных путях введения после частичной гепатэктомии

У зрелых и старых лабораторных животных после проведения частичной гепатэктомии количество обнаруженных меченых ММСК в печени при введении клеток в хвостовую вену, v.portae, a.hepatica достоверно не отличалось. При интраперитонеальном способе введения клеток в печени оказалось существенно меньше меченых ММСК по сравнению с количеством меченых ММСК, обнаруженных при остальных путях введения. При сравнении с данными, полученными в физиологических условиях, выявлено значительное повышение меченых клеток в печени при всех изучаемых путях введения клеток в обеих возрастных группах (таблица 5).

Количество обнаруженных меченых ММСК в печени
через 1 сутки после частичной гепатэктомии

Путь введения	% от введенных клеток	
	Зрелые	Старые
В хвостовую вену	10,28±1,18 **	7,43±0,71 °°
v.portae	10,32±1,03 **	7,19±0,60 °°
a.hepatica	10,46±0,96 **	7,24±0,62 °°
Внутрибрюшинно	0,58±0,047* **	0,37±0,027° °°

Примечание:

* отличие от показателей содержания клеток в печени у зрелых лабораторных животных при разных способах введения, достоверно с $p < 0,05$;

** отличие от показателей содержания клеток в печени у зрелых лабораторных животных в физиологических условиях;

° отличие от показателей содержания клеток в печени у старых лабораторных животных при разных способах введения, достоверно с $p < 0,05$;

°° отличие от показателей содержания клеток в печени у старых лабораторных животных без повреждения печени, достоверно с $p < 0,05$

При изучении распределения введенных ММСК и ГСК животным разного возраста после частичной гепатэктомии установлено повышение содержания меченных флюорохромами клеток в печени при введении в хвостовую вену, в портальную вену, печеночную артерию по сравнению с количеством клеток, обнаруженных в печени, при внутрибрюшинном способе введения. В то же время выявлено, что содержание клеток в печени после их введения в хвостовую латеральную вену, после введения клеток в портальную вену, а также печеночную артерию достоверно не отличалось. При сравнении содержания меченых клеток в печени после ее резекции отмечено достоверное их увеличение по сравнению с количеством трансплантированных ММСК и ГСК в печени при их введении в физиологических условиях (таблица 6).

Количество обнаруженных меченых клеток в печени через 1 сутки после
частичной гепатэктомии

Путь введения	% от введенных клеток			
	Зрелые		Старые	
	ММСК	ГСК	ММСК	ГСК
В хвостовую вену	10,29±1,12**	5,58±0,42**	7,42±0,74 ^{°°}	4,24±0,37 ^{°°}
v.portae	10,52±1,04**	6,19±0,62**	7,38±0,62 ^{°°}	4,47±0,35 ^{°°}
a.hepatica	10,39±0,93**	5,86±0,57**	7,15±0,60 ^{°°}	4,72±0,38 ^{°°}
Внутрибрюшинно	0,53±0,05* **	0,50±0,043* **	0,32±0,02 [°]	0,30±0,02 [°]

Примечание:

* отличие от показателей содержания клеток в печени у зрелых лабораторных животных при разных способах введения, достоверно с $p < 0,05$;

** отличие от показателей содержания клеток в печени у зрелых лабораторных животных в физиологических условиях;

[°] отличие от показателей содержания клеток в печени у старых лабораторных животных при разных способах введения, достоверно с $p < 0,05$;

^{°°} отличие от показателей содержания клеток в печени у старых животных без повреждения печени, достоверно с $p < 0,05$

Проведение сочетанной трансплантации меченых ММСК и ПКП животным разного возраста после субтотальной резекции показало, что количество меченых клеток в печени оказалось существенно ниже при внутрибрюшинном введении, чем при остальных изучаемых путях введения. При этом достоверной разницы в количестве обнаруженных меченых клеток в печени при введении клеток в хвостовую вену, портальную вену, печеночную артерию не обнаружено. При сравнении с данными, полученными при введении меченых клеток в физиологических условиях, выявлено значительно большее количество меченых ММСК и ПКП после резекции печени при введении клеток в хвостовую вену, портальную артерию, печеночную вену (таблица 7).

Количество обнаруженных меченых клеток в печени
через 1 сутки после частичной гепатэктомии

Путь введения	% от введенных клеток			
	Зрелые		Старые	
	ММСК	ПКП	ММСК	ПКП
В хвостовую вену	10,43±1,05**	7,34±0,63**	7,33±0,67 ^{°°}	5,48±0,46 ^{°°}
v.portae	10,48±1,02**	7,26±0,67**	7,22±0,65 ^{°°}	5,26±0,48 ^{°°}
a.hepatica	10,27±0,94**	7,19±0,72**	7,39±0,66 ^{°°}	5,25±0,50 ^{°°}
Внутрибрюшинно	0,50±0,04* **	0,48±0,04* **	0,34±0,03 ^{° °°}	0,32±0,03 ^{° °°}

Примечание:

* отличие от показателей содержания клеток в печени у зрелых лабораторных животных при разных способах введения, достоверно с $p < 0,05$;

** отличие от показателей содержания клеток в печени у зрелых лабораторных животных в физиологических условиях;

[°] отличие от показателей содержания клеток в печени у старых животных при разных способах введения, достоверно с $p < 0,05$;

^{°°} отличие от показателей содержания клеток в печени у старых животных без повреждения печени, достоверно с $p < 0,05$

**Определение меченых клеток в печени при разных путях введения
в условиях острого токсического повреждения печени**

Через 1 сутки после введения меченых ММСК зрелым и старым лабораторным животным в условиях острого токсического повреждения печени получено, что количество обнаруженных клеток в печени не отличается при таких путях введения как: в хвостовую вену, в портальную вену, печеночную артерию. При внутрибрюшинном введении количество обнаруженных клеток в печени достоверно ниже по сравнению с остальными изучаемыми путями введения. Количество меченых клеток, обнаруженных в печени, при всех изучаемых путях введения в условиях патологии печени достоверно выше по сравнению с количеством флуоресцирующих клеток, обнаруженных в печени, в физиологических условиях (таблица 8).

Количество обнаруженных меченых ММСК в печени через 24 часа после трансплантации при токсическом повреждении печени

Путь введения	% от введенных клеток	
	Зрелые	Старые
В хвостовую вену	13,76±1,19**	9,84±0,83 ^{°°}
v.portae	14,02±1,27**	9,76±0,80 ^{°°}
a.hepatica	13,89±1,20**	10,02±0,95 ^{°°}
Внутрибрюшинно	0,62±0,057* **	0,41±0,03 ^{° °°}

Примечание:

* отличие от показателей содержания клеток в печени у зрелых лабораторных животных при разных способах введения, достоверно с $p < 0,05$;

** отличие от показателей содержания клеток в печени у зрелых лабораторных животных в физиологических условиях;

[°] отличие от показателей содержания клеток в печени у старых лабораторных животных при разных способах введения, достоверно с $p < 0,05$;

^{°°} отличие от показателей содержания клеток в печени у старых животных без повреждения печени.

При проведении котрансплантации ММСК и ГСК животным с токсическим повреждением печени обнаружено, что при внутрибрюшинном способе введения клеток, количество флуоресцентных клеток в печени достоверно ниже, чем при остальных изучаемых путях введения.

При этом количество обнаруженных меченых клеток в печени при введении клеток в хвостовую вену, в портальную вену или в печеночную артерию достоверно не отличается. Также выявлено, что при трансплантации клеток в условиях токсического повреждения печени в печени обнаруживается меченых клеток существенно больше, чем в физиологических условиях. Данная закономерность прослеживается и у зрелых, и у старых лабораторных животных (таблица 9).

Количество обнаруженных меченых клеток в печени при остром токсическом повреждении печени

Путь введения	% от введенных клеток			
	Зрелые		Старые	
	ММСК	ГСК	ММСК	ГСК
В хвостовую вену	14,12±1,35**	10,34±0,93**	9,83±0,87 [°]	7,48±0,66 ^{°°}
v.portae	13,88±1,23**	10,26±0,87**	10,02±0,91 [°]	7,26±0,68 ^{°°}
a.hepatica	14,77±1,44**	10,29±0,82**	10,19±0,95 [°]	7,25±0,62 ^{°°}
Внутрибрюшинно	0,54±0,05* **	0,46±0,02* **	0,36±0,03 ^{° °}	0,32±0,02 ^{° °}

Примечание:

* отличие от показателей содержания клеток в печени у зрелых лабораторных животных при разных способах введения, достоверно с $p < 0,05$;

** отличие от показателей содержания клеток в печени у зрелых лабораторных животных в физиологических условиях;

[°] отличие от показателей содержания клеток в печени у старых лабораторных животных при разных способах введения, достоверно с $p < 0,05$;

^{°°} отличие от показателей содержания клеток в печени у старых лабораторных животных в физиологических условиях

В условиях острого токсического повреждения печени при проведении сочетанной трансплантации ММСК и ПКП обнаружено схожее распределение клеток при разных путях введения, как и при резекции печени. Так выявлено, что при введении клеток в хвостовую вену, портальную вену, печеночную артерию количество обнаруженных меченых клеток в печени зрелых и старых лабораторных животных не изменяется. При внутрибрюшинном введении количество меченых клеток в печени выявлено существенно меньше по сравнению с другими изучаемыми путями введения. При этом показано, что в условиях токсического повреждения печени при всех исследуемых путях введения количество обнаруженных меченых клеток в печени значительно выше по сравнению с количеством меченых клеток, выявляемым в печени в физиологических условиях (таблица 10).

Количество обнаруженных меченых клеток в печени при остром токсическом повреждении печени

Путь введения	% от введенных клеток			
	Зрелые		Старые	
	ММСК	ПКП	ММСК	ПКП
В хвостовую вену	14,03±1,30**	11,86±1,06**	10,03±0,97 ^{°°}	7,82±0,70 ^{°°}
v.portae	14,18±1,32**	11,90±1,10**	10,11±1,05 ^{°°}	7,86±0,73 ^{°°}
a.hepatica	14,27±1,34**	12,09±1,13**	10,09±0,94 ^{°°}	8,01±0,78 ^{°°}
Внутрибрюшинно	0,50±0,04*,**	0,48±0,04*	0,37±0,03 ^{°,°°}	0,35±0,03 [°]

Примечание:

* отличие от показателей содержания клеток в печени у зрелых лабораторных животных при разных способах введения, достоверно с $p < 0,05$;

** отличие от показателей содержания клеток в печени у зрелых лабораторных животных в физиологических условиях;

[°] отличие от показателей содержания клеток в печени у старых лабораторных животных при разных способах введения, достоверно с $p < 0,05$;

^{°°} отличие от показателей содержания клеток в печени у старых лабораторных животных в физиологических условиях.

3.2. Морфофункциональная характеристика печени

зрелых и старых лабораторных мышей

Производился анализ морфофункционального состояния печени мышей разного возраста без повреждения печени на 1, 3, 7 сутки после введения 0,9% раствора NaCl.

При сравнении морфометрических показателей печени мышей разного возраста выявлено, что в отличие от зрелых мышей печень старых животных характеризуется меньшим числом гепатоцитов на единицу площади, при этом клетки более крупные (за счет пропорционального увеличения, как ядра, так и цитоплазмы, в результате чего ЯЦИ не меняется). С возрастом в печени возрастает количество двухъядерных клеток, уровень запрограммированной клеточной гибели и снижается митотическая активность, а также увеличивается количество гепатоцитов с микроядрами (таблица 11).

Основные морфологические показатели печени

Показатели	Сроки наблюдения			Среднее по всем срокам наблюдения
	1 сутки	3-и сутки	7 сутки	
Зрелые мыши				
Масса органа, г	1,80±0,13	1,81±0,15	1,76±0,13	1,79±0,14*
Площадь гепатоцитов (мкм ²) в гистологическом препарате	264,8±6,61	267,53±6,39	264,66±5,87	265,6±6,23
Площадь цитоплазмы гепатоцитов (мкм ²) в гистологическом препарате	214,33±10,33	219,14±7,12	214,21±8,10	215,89±8,68
Площадь ядер гепатоцитов (мкм ²) в гистологическом препарате	50,57±3,80	48,40±3,57	50,46±3,29	49,81±3,42
Число гепатоцитов (на 1 мм ²)	1567,57±102,90	1525,57±101,06	1538,14±103,59	1543,76±102,35
Ядерно-цитоплазматический индекс	0,24±0,03	0,22±0,02	0,24±0,02	0,23±0,02
Митотический индекс, ‰	0,76±0,07	0,74±0,06	0,73±0,06	0,74±0,06
Апоптотический индекс, ‰	0,41±0,05	0,43±0,04	0,39±0,03	0,41±0,04
Число двуядерных гепатоцитов на 1 мм ²	233,87±12,28	234,43±9,92	237,29±8,24	235,20±10,06
Число клеток с микроядрами, ‰	2,20±0,17	2,21±0,18	2,18±0,11	2,20±0,16
Старые мыши				
Масса органа, г	2,21±0,17	2,22±0,14	2,18±0,11	2,20±0,14
Площадь гепатоцитов, (мкм ²) в гистологическом препарате	297,10±20,77	310,77±13,46	293,69±12,68	300,52±15,28*
Площадь цитоплазмы гепатоцитов (мкм ²) в гистологическом препарате	239,50±24,74	252,16±15,02	234,27±14,61	241,98±22,42*
Площадь ядер гепатоцитов, (мкм ²) в гистологическом препарате	57,60±3,97	58,61±3,61	59,41±2,73	58,54±3,67
Число гепатоцитов, (на 1 мкм ²)	1323,14±111,31	1301,14±124,98	1296,29±119,29	1306,86±118,26*
Ядерно-цитоплазматический индекс	0,25±0,04	0,23±0,03	0,26±0,03	0,25±0,03
Митотический индекс, ‰	0,39±0,04	0,39±0,04	0,38±0,05	0,39±0,04*
Апоптотический индекс, ‰	0,51±0,04	0,49±0,04	0,51±0,04	0,50±0,04*
Число двуядерных гепатоцитов (на 1 мкм ²)	261,06±9,61	259,66±10,65	265,71±11,02	262,81±11,56*
Число гепатоцитов с микроядрами, ‰	3,20±0,20	3,21±0,22	3,19±0,21	3,20±0,21*

Примечание:

* отличие показателей зрелых мышей, достоверно с $p < 0,05$

При сравнении показателей крови животных разного возраста, получено, что у старых мышей на фоне снижения концентрации альбуминов растут показатели содержания общего билирубина, АЛТ и ЩФ (таблица 12).

Таблица 12

Биохимические показатели крови зрелых и старых мышей

Показатели		Сроки наблюдения			Среднее по всем срокам наблюдения
		1 сутки	3-и сутки	7 суток	
Зрелые мыши					
Показатели белкового обмена	общий белок (г/л)	69,37±3,20	68,31±3,93	66,46±4,36	68,05±3,86
	альбумин (г/л)	30,3±2,83	30,84±4,25	31,41±3,38	30,85±3,42
	мочевина (ммоль/л)	5,76±1,28	6,21±0,87	6,11±0,61	6,03±0,93
Показатели цитоллиза	аспартатаминотрансфераза (Е/л)	98,53±8,42	97,26±8,47	104,56±9,07	100,12±8,85
	аланинаминотрансфераза (Е/л)	82,80±5,11	81,13±8,66	89,23±4,43	84,39±6,51
Показатель холестаза	щелочная фосфатаза (Е/л)	67,37±4,03	66,34±5,24	63,30±4,00	65,67±4,83
Глюкоза (ммоль/л)		6,10±0,57	5,73±0,69	6,44±0,62	6,09±0,61
Общ. Билирубин (мкмоль/л)		9,76±1,15	8,90±1,14	9,37±0,65	9,34±0,95
Фибриноген (г/л)		3,20±0,20	3,27±0,18	3,20±0,23	3,22±0,22
Старые мыши					
Показатели белкового обмена	общий белок (г/л)	73,39±4,42	73,07±4,56	75,24±4,32	73,9±4,36
	альбумин (г/л)	23,76±2,21	24,29±1,93	22,34±1,99	23,45±1,92*
	мочевина (ммоль/л)	6,20±0,43	6,46±0,67	6,27±0,65	6,31±0,56
Показатели цитоллиза	аспартатаминотрансфераза (Е/л)	102,73±7,83	102,39±9,52	101,19±8,41	102,10±8,44
	аланинаминотрансфераза (Е/л)	104,87±7,19	98,59±7,38	109,57±7,36	104,34±7,32*
Показатель холестаза	щелочная фосфатаза (Е/л)	78,61±5,82	78,74±6,04	75,56±5,11	77,64±5,94*
Глюкоза (ммоль/л)		5,93±0,36	5,69±0,41	5,79±0,44	5,80±0,39
Общий билирубин (мкмоль/л)		12,07±0,56	14,04±0,71	13,13±0,62	13,08±0,75*
Фибриноген (г/л)		3,80±0,23	3,93±0,29	3,80±0,26	3,84±0,25

Примечание:

* отличие от одноименного показателя зрелых мышей, достоверно с $p < 0,05$

Проводилось изучение морфометрических показателей печени при двух различных типах повреждения печени. Проведение частичной гепатэктомии – удаление массы гепатоцитов без прямого их повреждения. Острое токсическое повреждение – уменьшение массы гепатоцитов путем их повреждения четыреххлористым углеродом.

Морфофункциональные показатели печени после частичной гепатэктомии

После частичной гепатэктомии независимо от возраста животных уменьшается количество гепатоцитов на единицу площади, увеличивается размер их ядер, ЯЦИ, количество двуядерных клеток, МИ, АИ, количество гепатоцитов с микроядрами. При этом количество гепатоцитов на единицу площади, их размер к 7-м суткам нормализуются. Возрастные особенности состоят в том, что у зрелых животных размер гепатоцитов и объем их цитоплазмы увеличиваются с первых суток, а у старых позднее - на 3-и сутки. Также у зрелых животных отмечается более значительное увеличение митотического индекса (таблица 13).

Таблица 13

Морфологические показатели мышечей после частичной гепатэктомии

Показатели	Сроки после операции		
	1 сутки	3 сутки	7 сутки
Зрелые животные			
Масса органа, г	0,64±0,01 ¹	1,04±0,09 ^{1,3}	1,15±0,09 ^{1,2,3}
Площадь гепатоцитов (мкм ²) в гистологическом препарате	340,20±24,43 ¹	331,81±24,02 ¹	286,41±22,44 ³
Площадь цитоплазмы гепатоцитов (мкм ²) в гистологическом препарате	258,56±17,02 ¹	243,64±19,25 ¹	223,03±17,97
Площадь ядер гепатоцитов (мкм ²) в гистологическом препарате	81,64±7,45 ¹	67,13±7,01 ¹	63,39±5,12 ¹
Число гепатоцитов, (на 1 мкм ²)	1192,00±89,43 ¹	1206,71±91,96 ¹	1427,71±116,98 ³
Ядерно-цитоплазматический индекс	0,32±0,01 ¹	0,27±0,01 ^{1,3}	0,29±0,02
Митотический индекс, ‰	0,52±0,03	8,10±0,60 ^{1,3}	4,51±0,47 ^{1,3,4}
Апоптотический индекс, ‰	0,90±0,06	2,13±0,20 ¹	1,25±0,09 ^{1,3,4}
Число двуядерных гепатоцитов (на 1 мкм ²)	334,31±12,30 ¹	380,97±10,15 ^{1,3}	320,77±10,64 ^{1,4}
Число гепатоцитов с микроядрами, ‰	2,23±0,21	3,37±0,26 ¹	2,77±0,23 ¹
Старые животные			
Масса органа, г	0,82±0,07 ¹	1,25±0,09 ^{1,3}	1,68±0,11 ^{1,3,4}
Площадь гепатоцитов (мкм ²) в гистологическом препарате	360,70±30,80	379,31±32,58 ¹	348,19±28,36 ²
Площадь цитоплазмы гепатоцитов (мкм ²) в гистологическом препарате	225,07±20,25	261,57±24,08	227,13±15,37
Площадь ядер гепатоцитов (мкм ²) в гистологическом препарате	77,59±6,53 ¹	76,01±8,56 ¹	72,97±5,91
Число гепатоцитов, (на 1 мкм ²)	1021,00±91,71 ¹	996,43±76,65 ¹	1009,57±74,49 ^{1,2}
Ядерно-цитоплазматический индекс	0,35±0,02 ¹	0,29±0,01 ^{1,3}	0,32±0,02 ¹
Митотический индекс, ‰	0,42±0,03	2,81±0,27 ^{1,2}	1,50±0,10 ^{1,2,3,4}
Апоптотический индекс, ‰	1,08±0,15 ¹	2,29±0,20 ¹	1,81±0,17 ^{1,2,3}
Число двуядерных гепатоцитов (на 1 мкм ²)	320,74±24,49 ¹	343,43±25,8 ¹	325,74±22,52 ¹
Число гепатоцитов с микроядрами, ‰	3,23±0,23	5,11±0,44 ¹	4,60±0,37 ^{1,2,3,4}

Примечание:

- 1 – достоверно по отношению к интактным животным того же возраста,
- 2- достоверно по отношению к зрелым мышам,
- 3- достоверно по отношению к 1-м суткам
- 4- достоверно по отношению к 3-м суткам

После частичной гепатэктомии уже с первых суток, независимо от возраста мышей в крови снижаются уровень общего белка, альбуминов, мочевины, глюкозы, повышаются билирубин, активность АСТ, АЛТ и щелочной фосфатазы, а с третьих суток и фибриногена. В последующем показатели билирубина, АСТ, АЛТ и ЩФ прогрессивно снижаются, оставаясь на высоком уровне (таблица 14).

Таблица 14

Биохимические показатели при регенерации печени зрелых и старых мышей
после частичной гепатэктомии

Показатели		Сроки наблюдения			Среднее по всем срокам наблюдения
		1 сутки	3-и сутки	7 суток	
Зрелые мыши					
Показатели белкового обмена	общий белок (г/л)	51,29±4,81 ¹	50,03±4,82 ¹	44,27±3,61 ¹	51,29±4,81 ¹
	альбумин (г/л)	20,54±1,89 ¹	19,80±2,51 ¹	20,59±1,90 ¹	20,54±1,89 ¹
	мочевина (ммоль/л)	3,79±0,41 ¹	4,37±2,51 ¹	4,57±0,46 ¹	3,79±0,41 ¹
Показатель и цитолиза	аспартатаминотранс- фераза (Е/л)	416,79±29,76 ¹	209,53±13,85 ^{1,3}	153,86±16,96 _{1,3,4}	416,79±29,76 ¹
	аланинаминотранс- фераза (Е/л)	296,91±22,64 ¹	155,24±9,34 ^{1,3}	137,10±16,29 _{1,3}	296,91±22,64 ¹
Показатель холестаза	щелочная фосфатаза (Е/л)	136,10±4,66 ¹	106,67±10,45 ^{1,3}	83,11±5,93 _{1,3}	136,10±4,66 ¹
Уровень глюкозы (ммоль/л)		4,01±0,53 ¹	3,66±0,29 ¹	4,30±0,29 ¹	4,01±0,53 ¹
Общий билирубин (мкмоль/л)		19,84±2,85 ¹	21,99±5,47 ¹	15,41±2,76 ¹	19,84±2,85 ¹
Фибриноген (г/л)		2,93±0,22	2,00±0,17 ¹	2,20±0,23 ¹	2,93±0,22
Старые мыши					
Показатели белкового обмена	общий белок (г/л)	52,79±3,64 ¹	47,76±4,48 ¹	47,63±3,77 ¹	52,79±3,64 ¹
	альбумин (г/л)	18,77±1,46 ¹	17,11±2,36 ¹	17,13±1,42 ¹	18,77±1,46 ¹
	мочевина (ммоль/л)	4,40±0,34 ¹	4,49±0,39 ¹	4,54±0,35 ¹	4,40±0,34 ¹
Показатели цитолиза	аспартатаминотранс- фераза (Е/л)	462,80±31,91 ¹	212,14±19,08 ^{1,3}	183,59±16,79 _{1,3}	462,80±31,91 ¹
	аланинаминотранс- фераза (Е/л)	368,14±30,48 ¹	211,50±18,06 ^{1,3}	175,01±12,82 _{1,3}	368,14±30,48 ¹
Показатель холестаза	щелочная фосфатаза (Е/л)	163,96±30,48 ¹	130,37±25,94 ^{1,3}	114,89±9,67 _{1,2,3}	163,96±30,48 ¹
Глюкоза (ммоль/л)		3,84±0,32 ¹	4,13±0,72 ¹	4,26±0,39 ¹	3,84±0,32 ¹
Общий билирубин (мкмоль/л)		17,79±1,56 ¹	25,89±2,27 ^{1,3}	18,14±2,21 ^{1,4}	17,79±1,56 ¹
Фибриноген, г/л		3,47±0,21	2,27±0,26 ^{1,3}	2,44±0,18 ¹	3,47±0,21

Примечание:

- 1 - достоверно по отношению к интактным того же возраста
- 2 - достоверно по отношению к зрелым мышам
- 3 - достоверно по отношению к 1-м суткам
- 4 - достоверно по отношению к 3-м суткам

Морфофункциональные показатели печени в условиях ее токсического повреждения

На первые сутки после введения тетрахлорметана отмечаются морфологические признаки острого токсического повреждения печени: ступенчатые и мостовидные некрозы гепатоцитов, выраженная лимфогистоцитарная инфильтрация, полнокровие венозных сосудов, вакуольная дистрофия гепатоцитов 2/3 долек. На третьи сутки после введения четыреххлористого углерода сохраняются ступенчатые и мостовидные некрозы гепатоцитов, воспалительная инфильтрация зон некрозов, полнокровие центральных и портальных вен, дистрофия гепатоцитов (рисунки 31, 32, 33). На 7 сутки отмечается умеренный фокальный некроз гепатоцитов, полнокровие сосудов, незначительная дистрофия гепатоцитов.

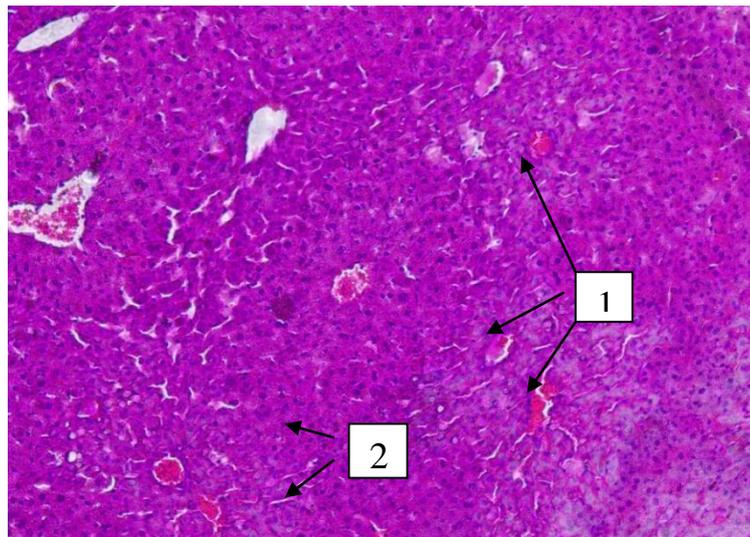


Рис. 31. Ступенчатые некрозы гепатоцитов.

1 - полнокровие сосудов,
2 – некрозы гепатоцитов.

Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$.

У старых животных введение тетрахлорметана приводит к более выраженным некротическим изменениям в печени в исследуемые сроки по сравнению с зрелыми животными. Это связано с тем, что с возрастом изменяется соотношение эффективности антиоксидантной активности (АОА) и уровня перекисного окисления липидов (ПОЛ) в сторону увеличения выраженности ПОЛ [116]. Четыреххлористый углерод оказывает повреждающее действие на клетки

через образование в гепатоците под воздействием микросомальных оксидаз продуктов его распада – свободных радикалов CCl_3 и Cl . Они вызывают повреждение мембраны клеток и стимулируют в них реакции ПОЛ [22, 50, 56, 57, 68, 80]. У старых животных также более выражены дистрофические изменения в гепатоцитах, что может быть обусловлено снижением в старом организме интенсивности процессов аутофагии [298].

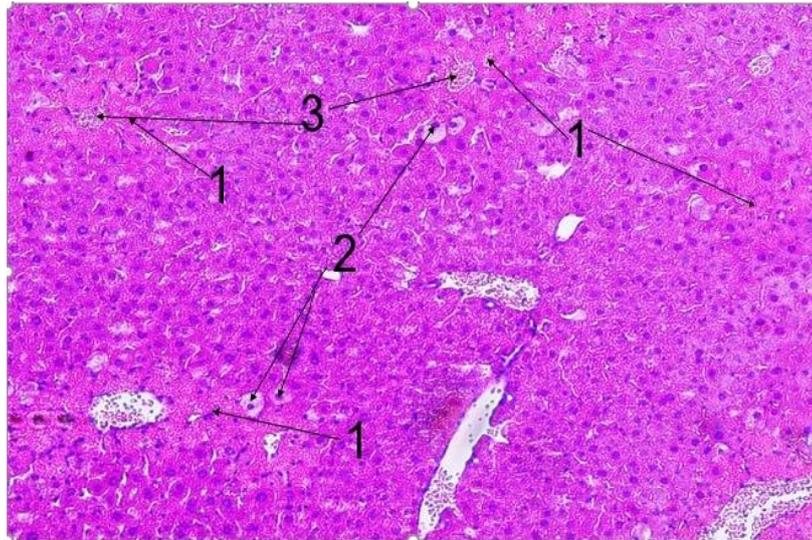


Рис. 32. Ступенчатые некрозы гепатоцитов.
1-зоны некроза, 2 – вакуольная дистрофия гепатоцитов,
3 – полнокровие сосудов. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$

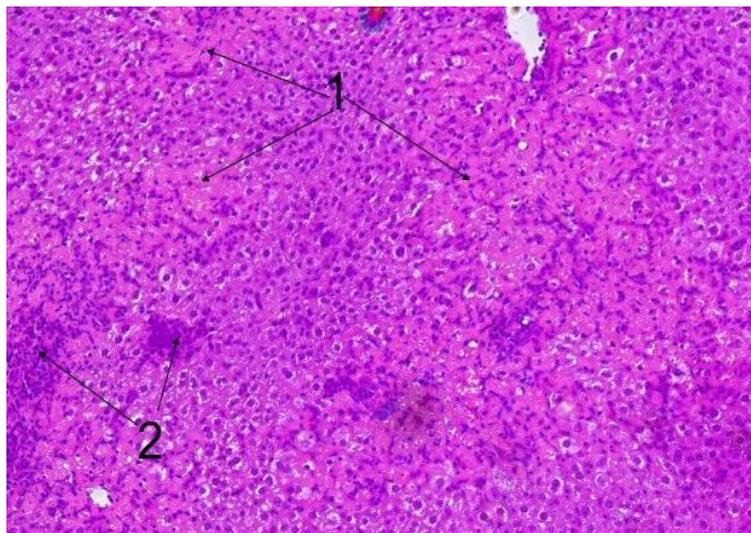


Рис. 33. Ступенчатые некрозы гепатоцитов.
1 –некрозы гепатоцитов, 2 – лейкоцитарная инфильтрация.
Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$.

Реализация механизмов аутофагии позволяет клетке удалять старые, поврежденные структуры, способствует снижению образования дистрофически измененных клеток. Следствием выявленных изменений был более высокий уровень индекса воспалительной активности у старых животных по сравнению со зрелыми (таблица 15).

Таблица 15

Выраженность воспалительных явлений в печени зрелых и старых мышей
после введения CCl_4

	Зрелые			Старые		
	1 сутки	3 сутки	7 сутки	1 сутки	3 сутки	7 сутки
Перипортальные некрозы	6,0±0,52	5,6±0,54	3,8±0,32	7,2±0,63*	6,8±0,57*	4,6±0,41*
Внутридольковые некрозы и дистрофия гепатоцитов	3,1±0,24	2,9±0,22	2,0±0,17	3,9±0,28*	3,5±0,30*	2,6±0,22*
Воспалительный инфильтрат в портальных трактах	3,3±0,30	3,1±0,21	2,2±0,20	3,9±0,31	3,7±0,30	2,8±0,22
Итого ИВА:	12,4±1,13	11,6±1,08	8,0±0,76	15,0±1,20*	14,0±1,23*	10,0±0,82*

Примечание:

* достоверно по отношению к зрелым мышам, $p < 0,05$.

При токсическом действии на печень мышей четыреххлористым углеродом уже на первые сутки в органе, независимо от возраста животного, отмечаются уменьшение размеров гепатоцитов за счет цитоплазмы, вероятно, вследствие дегидратации и, как результат, увеличивается ЯЦИ, отмечается увеличение числа двухъядерных клеток, также растут митотический и апоптотический индексы. В последующем митотический индекс остается на одном уровне во все сроки наблюдения, а апоптотический индекс к 3-м снижается, хотя и остается повышенным. Прогрессивно уменьшается и количество двухъядерных гепатоцитов к седьмым суткам.

Вместе с тем реакция имеет возрастные особенности. Так у зрелых животных количество гепатоцитов на единицу площади возрастает, а у старых нет. У старых животных с 3-х суток увеличивается размер ядра, МИ увеличивается меньше, а АИ на 7-е сутки больше, чем у зрелых (таблица 16).

Морфологические показатели печени зрелых и старых мышей
после введения CCl_4

Показатели	Сроки после операции		
	1 сутки	3 сутки	7 сутки
Зрелые мыши			
Площадь гепатоцитов ($мкм^2$) в гистологическом препарате	186,43±12,43 ¹	205,03±19,60 ¹	204,71±16,27 ¹
Площадь цитоплазмы гепатоцитов ($мкм^2$) в гистологическом препарате	132,83±11,71 ¹	151,76±17,96 ¹	143,77±14,80 ¹
Площадь ядер гепатоцитов ($мкм^2$) в гистологическом препарате	53,60±3,60	53,27±2,32	60,94±4,68 ¹
Число гепатоцитов, (на 1 $мкм^2$)	2060,71±121,10 ¹	1902,86±125,55 ¹	1970,71±139,96 ¹
Ядерно-цитоплазматический индекс	0,41±0,04 ¹	0,35±0,03 ¹	0,43±0,04 ¹
Митотический индекс, ‰	17,74±2,13 ¹	15,20±1,20 ¹	17,06±1,64 ¹
Апоптотический индекс, ‰	4,87±0,36 ¹	3,70±0,31 ³	3,74±0,31 ^{1,3}
Число двуядерных гепатоцитов (на 1 $мкм^2$)	830,43±52,65 ¹	474,43±46,08 ^{1,3}	388,57±30,94 ^{1,3}
Количество гепатоцитов с микроядрами, ‰	2,26±0,21	5,39±0,41	5,46±0,43
Старые мыши			
Площадь гепатоцитов ($мкм^2$) в гистологическом препарате	212,99±19,27 ¹	228,04±17,47 ¹	225,73±19,00 ¹
Площадь цитоплазмы гепатоцитов ($мкм^2$) в гистологическом препарате	151,34±15,72 ¹	157,50±15,14 ¹	148,93±14,02 ¹
Площадь ядер гепатоцитов ($мкм^2$) в гистологическом препарате	61,64±4,26	70,54±5,34 ¹	76,80±6,74 ¹
Число гепатоцитов, (на 1 $мкм^2$)	1475,29±127,18 ²	1431,29±116,33 ²	1408,86±117,88 ²
Ядерно-цитоплазматический индекс	0,41±0,03 ¹	0,45±0,03 ^{1,2}	0,52±0,02 ^{1,3}
Митотический индекс, ‰	7,59±0,50 ^{1,2}	6,80±0,51 ^{1,2}	7,37±0,40 ^{1,2}
Апоптотический индекс, ‰	5,64±0,45 ¹	4,34±0,39 ^{1,3}	4,60±0,17 ^{1,2}
Число двуядерных гепатоцитов на 1 $мм^2$	1035,86±92,41 ¹	736,14±56,37 ^{1,2,3}	471,43±30,49 ^{1,3,4}
Число гепатоцитов с микроядрами, ‰	3,27±0,26	8,43±0,62	8,57±0,74

Примечание:

1 - достоверно по отношению к интактным животным того же возраста (группа сравнения), $p < 0,05$.

2 - достоверно по отношению к зрелым мышам, $p < 0,05$.

3 - достоверно по отношению к 1-м суткам, $p < 0,05$.

4 - достоверно по отношению к 3-м суткам, $p < 0,05$.

При токсическом действии на печень мышей CCl_4 уже с первых суток, независимо от возраста снижаются в крови уровень глюкозы, повышаются билирубин, активность АСТ, АЛТ и ЩФ. С третьих суток понижена концентрация белка, альбуминов, фибриногена. В последующем показатели билирубина, АСТ, АЛТ и щелочной фосфатазы прогрессивно снижаются, оставаясь на высоком уровне.

Возрастные различия отмечаются лишь в более высокой активности АЛТ у старых животных на 3-и сутки наблюдения, нормализация уровня глюкозы у зрелых животных на 7-е сутки (таблица 17).

Таблица 17

Биохимические показатели зрелых и старых мышей после введения CCl_4

Показатели		Сроки наблюдения			Среднее по всем срокам наблюдения
		1 сутки	3-и сутки	7 сутки	
Зрелые мыши					
Показатели белкового обмена	общий белок (г/л)	60,15±5,68	48,96±3,39 ¹	51,18±4,58 ¹	60,15±5,68
	альбумин (г/л)	25,71±2,19	20,51±1,59 ¹	22,74±1,86 ¹	25,71±2,19
	мочевина (ммоль/л)	5,11±0,34	5,33±0,48	6,41±0,49	5,11±0,34
Показатели цитоллиза	аспартатаминотранс- фераза (Е/л)	211,03±14,55 ¹	170,55±11,13 _{1,3}	138,45±9,29 _{1,3,4}	211,03±14,55 ₁
	Аланинаминотранс- фераза (Е/л)	213,90±15,20 ¹	166,46±10,36 _{1,3}	154,50±9,85 _{1,3}	213,90±15,20 ₁
Показатель холестаза	щелочная фосфатаза (Е/л)	122,89±9,21 ¹	106,73±9,58 ¹	91,20±7,98 ¹	122,89±9,21 ¹
Глюкоза (ммоль/л)		4,28±0,40 ¹	4,25±0,36 ¹	5,90±0,50	4,28±0,40 ¹
Общ. билирубин (мкмоль/л)		15,14±1,09 ¹	11,85±0,90 ¹	11,89±0,67 ¹	15,14±1,09 ¹
Фибриноген (г/л)		3,20±0,20	2,34±0,18 ^{1,3}	2,37±0,20 ^{1,3}	3,20±0,20
Старые мыши					
Показатели белкового обмена	общий белок (г/л)	64,54±5,72	50,14±4,04 ¹	54,05±4,80 ¹	64,54±5,72
	альбумин (г/л)	22,24±2,43	15,86±1,71 ¹	17,06±1,71 ¹	22,24±2,43
	уровень мочевины (ммоль/л)	5,79±0,47	6,08±0,53	6,53±0,60	5,79±0,47
Показатели цитоллиза	аспартатаминотранс- фераза (Е/л)	235,99±21,06 ¹	180,85±11,76 ₁	143,78±10,28 _{1,3,4}	235,99±21,06 ₁
	аланинаминотранс- фераза (Е/л)	249,95±16,59 ₁	210,95±12,18 _{1,2}	177,60±12,98 _{1,3,4}	249,95±16,59 ₁
Показатель холестаза	Щелочная фосфатаза (Е/л)	152,08±11,73 ₁	125,46±10,07 _{1,3}	103,04±9,10 _{1,2}	152,08±11,73 ₁
Глюкоза (ммоль/л)		3,81±0,33 ¹	4,28±0,34 ¹	4,51±0,44 ¹	3,81±0,33 ¹
Общ. билирубин (мкмоль/л)		17,24±1,54 ¹	14,61±1,09 ^{1,3}	14,06±1,34 ¹	17,24±1,54 ¹
Фибриноген, г/л		3,50±0,26	2,49±0,19 ^{1,3}	2,50±0,17 ¹	3,50±0,26

Примечание:

- 1 - достоверно по отношению к интактным того же возраста (группа сравнения), $p < 0,05$.
- 2 - достоверно по отношению к зрелым мышам, $p < 0,05$.
- 3 - достоверно по отношению к 1-м суткам, $p < 0,05$.
- 4 - достоверно по отношению к 3-м суткам, $p < 0,05$.

Таким образом, выявлены особенности регенерации печени при токсическом ее повреждении в зависимости от возраста. Так при частичной гепатэктомии количество гепатоцитов на единицу площади уменьшается, и у

зрелых, и у старых лабораторных животных, а при токсическом повреждении печени у зрелых растёт, а у старых не меняется. Это связано с тем, что при резекции печени, и у зрелых, и у старых животных размер гепатоцитов увеличивается, а при токсическом действии уменьшается. Увеличение размеров гепатоцитов при частичной гепатэктомии происходит за счёт компенсаторной гипертрофии клеток. Уменьшение размеров гепатоцитов при токсическом повреждении может быть связано с выходом ферментов из клеток, повреждением структуры органелл. При резекции печени независимо от возраста животных площадь ядра растёт с первых суток, при токсическом повреждении печени с 3-х суток. Увеличение размера ядер, вероятно, возникает как результат полиплоидизации клеток. В связи с этим отмечается увеличение ЯЦИ и при частичной гепатэктомии, и при токсическом повреждении печени независимо от возраста. При резекции печени площадь цитоплазмы растёт у зрелых и не меняется у старых лабораторных животных, при токсическом повреждении печени этот показатель уменьшается независимо от возраста.

Количество двухъядерных гепатоцитов растёт на первые сутки и снижается к 7-м независимо от возраста и от вида повреждения. Увеличение количества двухъядерных гепатоцитов может быть результатом полиплоидизирующих митозов – митозов, не сопровождающихся цитотомией. Редуцирование митотического цикла не сопровождается секрецией многих регуляторных белков, то есть не расходуется столько энергии, сколько требуется для полного митоза. В условиях токсического повреждения печени клетки выбирают энергетически более выгодный путь.

Отмечен большой рост митотической активности у зрелых животных, чем у старых, и при частичной гепатэктомии, и при токсическом воздействии. Запрограммированная клеточная гибель больше увеличивается при токсическом повреждении печени.

И при частичной гепатэктомии, и при токсическом воздействии, независимо от возраста, в крови снижается уровень глюкозы, повышаются билирубин, активность АСТ, АЛТ и ЩФ. В последующем показатели билирубина, АСТ, АЛТ

и ЩФ прогрессивно снижаются, оставаясь на высоком уровне. Уровень общего белка, альбуминов, мочевины при резекции снижаются с первых суток, а при токсическом воздействии с третьих.

Возрастные различия при токсическом воздействии отмечаются лишь в более высокой активности АЛТ у старых животных на 3-и сутки наблюдения, и глюкоза возвращается к нормальному уровню у зрелых животных на 7-е сутки.

3.3. Влияние ММСК на показатели морфофункционального состояния печени без её повреждения у животных разного возраста

Анализ изменений морфофункционального состояния печени после введения ММСК животным без повреждения печени позволяет оценить влияние клеток на ее физиологическую регенерацию. Для этого оценивали массу печени на первые, третьи и седьмые сутки после введения ММСК. Также проводили анализ основных морфометрических показателей печени: количество гепатоцитов на мм², площадь гепатоцитов, площадь цитоплазмы гепатоцитов, площадь ядра гепатоцитов, ядерно-цитоплазматическое отношение, число двуядерных гепатоцитов. Также изучалась митотическая активность клеток, выраженность запрограммированной клеточной гибели, активность репаративных процессов в клетках печени. С помощью изучения биохимических показателей крови оценивали функцию печени.

Проведение анализа морфометрических показателей печени на первые, третьи, седьмые сутки после введения ММСК показало отсутствие достоверных отличий и у зрелых и у старых мышей по сравнению с животными, которым вводили NaCl (таблицы 18, 19, 20).

Влияние трансплантации ММСК на морфометрические показатели печени
на 1 сутки после введения клеток

Показатели	Значение			
	Зрелые		Старые	
	NaCl	ММСК	NaCl	ММСК
Масса печени, г	1,80±0,13	1,78±0,12	2,21±0,17	2,30±0,22
Апоптотический индекс, ‰	0,41±0,05	0,42±0,04	0,51±0,04	0,52±0,05
Количество гепатоцитов с микроядрами, ‰	2,20±0,17	2,27±0,18	3,20±0,20	3,13±0,23
Митотический индекс, ‰	0,76±0,07	0,75±0,05	0,39±0,04	0,40±0,04
Количество гепатоцитов На 1 мкм ²	1567,57±102,90	1598,94±103,27	1323,14±111,31	1296,14±109,02
Площадь гепатоцита (мкм ²)	264,90±6,60	262,43±6,58	310,77±13,46	305,40±16,14
Площадь цитоплазмы гепатоцита (мкм ²)	214,33±10,33	212,04±9,64	252,16±15,02	248,00±14,54
Площадь ядра гепатоцита (мкм ²)	50,57±3,80	50,39±3,13	58,61±3,61	57,40±3,63
Ядерно-цитоплазматический индекс	0,24±0,03	0,24±0,03	0,23±0,03	0,23±0,02
Количество двухъядерных гепатоцитов на 1 мм ²	233,43±12,2	234,14±8,41	261,06±15,61	268,79±17,16

Таблица 19

Влияние трансплантации ММСК на морфометрические показатели печени
на 3 сутки после введения клеток

Показатели	Значение			
	Зрелые		Старые	
	NaCl	ММСК	NaCl	ММСК
масса печени, г	1,81±0,15	1,77±0,11	2,22±0,14	2,27±0,16
апоптотический индекс, ‰	0,43±0,04	0,41±0,04	0,49±0,04	0,52±0,05
количество гепатоцитов с микроядрами, ‰	2,17±0,17	2,21±0,18	3,21±0,22	3,27±0,23
митотический индекс, ‰	0,74±0,06	0,75±0,06	0,39±0,04	0,40±0,04
количество гепатоцитов на 1 мкм ²	1525,57±101,06	1548,69±122,61	1301,14±124,98	1320,29±112,33
площадь гепатоцита (мкм ²)	267,54±6,38	264,0±7,49	310,77±13,46	305,40±16,14
площадь цитоплазмы гепатоцита (мкм ²)	219,14±7,12	214,2±5,57	252,16±15,02	248,00±14,54
площадь ядра гепатоцита (мкм ²)	48,40±3,57	49,8±3,0	58,16±3,61	57,40±3,63
ядерно-цитоплазматический индекс	0,22±0,02	0,23±0,01	0,23±0,03	0,23±0,02
количество двухъядерных гепатоцитов на 1 мм ²	234,43±9,92	235,86±10,12	259,66±10,65	262,79±9,16

Влияние трансплантации ММСК на морфофункциональное состояние печени
на 7 сутки после введения клеток

Показатели	Значение			
	Зрелые		Старые	
	NaCl	ММСК	NaCl	ММСК
Масса печени, г	1,76±0,13	1,79±0,14	2,18±0,11	2,12±0,11
Апоптотический индекс, ‰	0,39±0,03	0,41±0,04	0,51±0,04	0,53±0,05
Количество гепатоцитов с микроядрами, ‰	2,10±0,17	2,04±0,19	3,19±0,21	3,23±0,22
Митотический индекс, ‰	0,73±0,06	0,76±0,05	0,38±0,05	0,39±0,04
Активность ферментов семейства PАРР в клетках печени, MFI, усл.ед.	45,2±4,1	42,6±3,9	30,4±2,8	33,8±3,2
Количество гепатоцитов На 1 мкм ²	1538,14±103,59	1543,96±111,73	1296,29±119,84	1339,29±114,82
Площадь гепатоцита (мкм ²)	264,67±15,86	261,30±17,03	293,69±12,68	296,19±19,64
Площадь цитоплазмы гепатоцита (мкм ²)	214,21±18,10	212,9±19,17	234,27±14,61	237,69±17,33
Площадь ядра гепатоцита (мкм ²)	50,46±3,29	48,4±2,71	59,41±2,73	58,50±4,11
Ядерно-цитоплазматический индекс	0,24±0,02	0,23±0,02	0,26±0,03	0,25±0,02
Количество двухъядерных гепатоцитов на 1 мм ²	237,29±18,24	235,86±11,59	265,71±11,02	267,61±12,47

Таким образом, проведенные исследования показали, что трансплантация ММСК мышам не сопровождается изменением морфометрических показателей печени на первые, третьи, седьмые сутки после введения.

Введение ММСК не привело к изменению биохимических показателей крови у зрелых и старых мышей в изучаемые сроки (таблицы 21, 22, 23).

В результате проведенного исследования получено, что введение ММСК мышам разного возраста не сопровождается изменением биохимических показателей крови на первые, третьи, седьмые сутки после введения клеток.

Основные биохимические показатели крови на 1 сутки после внутривенной трансплантации ММСК

Показатели		Значение			
		Зрелые		Старые	
		NaCl	ММСК	NaCl	ММСК
Показатели белкового обмена	общ. белок (г/л)	69,37±3,20	69,36±3,85	73,39±4,42	74,84±3,17
	альбумин (г/л)	30,03±2,83	32,14±2,89	23,76±2,21	24,40±2,26
	мочевина (ммоль/л)	5,76±1,28	5,37±1,05	6,20±0,43	6,13±0,66
Показатели цитоллиза	аспартатаминотрансфе- раза (Е/л)	98,53±8,42	101,09±3,58	102,73±7,83	106,53±9,58
	аланинаминотрансфераза (Е/л)	82,80±5,11	84,49±3,35	104,87±7,19	101,93±7,08
Показатель холестаза	щелочная фосфатаза (Е/л)	67,37±4,03	65,16±4,24	78,61±5,82	76,47±2,92
Глюкоза (ммоль/л)		6,10±0,57	6,41±0,62	5,93±0,36	6,11±0,44
Общ. билирубин, (мкмоль/л)		9,76±1,15	10,60±1,43	12,07±0,46	13,30±0,74
Фибриноген (г/л)		3,20±0,20	3,29±0,24	3,80±0,23	3,71±0,24

Таблица 22

Основные биохимические показатели крови на 3 сутки после внутривенной
трансплантации ММСК

Показатели		Значение			
		Зрелые		Старые	
		NaCl	ММСК	NaCl	ММСК
Показатели белкового обмена	общий белок (г/л)	68,31±3,93	66,46±4,38	73,07±4,56	73,91±3,01
	альбумин (г/л)	30,84±4,25	35,59±4,90	24,29±1,93	25,97±2,15
	мочевина (ммоль/л)	6,21±0,87	6,79±1,36	6,46±0,67	6,26±0,54
Показатели цитоллиза	аспартатаминотранс- фераза (Е/л)	97,26±8,47	99,04±8,01	102,39±9,52	106,59±8,93
	аланинаминотранс- фераза (Е/л)	81,13±8,66	81,20±9,89	98,59±7,38	96,24±7,68
Показатель холестаза	щелочная фосфатаза (Е/л)	66,34±5,24	70,53±7,42	78,74±6,04	80,26±3,81
Уровень глюкозы (ммоль/л)		5,73±0,69	5,91±0,82	5,89±0,41	5,79±0,44
Общий билирубин, (мкмоль/л)		8,90±1,14	8,56±1,28	14,04±0,41	13,26±0,68
Фибриноген (г/л)		3,27±0,18	3,17±0,26	3,93±0,29	3,87±0,28

Основные биохимические показатели крови на 7 сутки после внутривенной трансплантации ММСК

Показатели		Значение			
		Зрелые		Старые	
		NaCl	ММСК	NaCl	ММСК
Показатели белкового обмена	общий белок (г/л)	66,46±4,36	68,87±4,76	72,24±4,32	70,83±2,63
	альбумин (г/л)	31,41±3,38	30,50±3,91	22,34±1,99	23,24±2,12
	мочевина (ммоль/л)	6,11±0,61	5,51±0,62	6,27±0,65	6,11±0,56
Показатели цитоллиза	аспартатаминотранс- фераза (Е/л)	104,56±9,07	94,71±9,25	101,19±8,41	98,24±7,44
	аланинаминотранс- фераза (Е/л)	89,23±4,43	83,99±7,9	109,57±7,36	104,13±7,15
Показатель холестаза	щелочная фосфатаза (Е/л)	63,30±4,00	64,64±7,02	75,56±5,11	77,73±3,97
Глюкоза (ммоль/л)		6,44±0,62	5,86±0,44	5,79±0,44	5,96±0,35
Общий билирубин (мкмоль/л)		9,37±0,65	9,07±0,82	13,13±0,62	12,41±0,53
Фибриноген (г/л)		3,20±0,23	3,21±0,27	3,80±0,26	3,74±0,27

Проведенные исследования также показали, что трансплантация ММСК животным без повреждения печени не приводит к изменению ее морфофункционального состояния. В обеих возрастных группах не произошло изменения содержания гепатоцитов с микроядрами. Это свидетельствует о том, что введение ММСК не приводит к нарушению регенерации в клетках печени. Также трансплантация ММСК не приводит к изменению уровня запрограммированной клеточной гибели и к изменению активности ферментов репарации семейства PARP. Таким образом, введение ММСК не оказывает влияния на физиологическую регенерацию печени.

3.4. Изучение влияния ММСК на морфофункциональное состояние печени животных разного возраста после частичной гепатэктомии

С целью оценки морфофункционального состояния печени на 1, 3, 7 сутки после трансплантации ММСК на фоне частичной гепатэктомии производилось определение массы печени, морфометрических показателей печени (число гепатоцитов на мм², площадь ядра гепатоцита, ядерно-цитоплазматическое отношение, число двуядерных гепатоцитов, митотический индекс,

апоптотический индекс), активность репаративных процессов в клетках печени. Функциональное состояние печени оценивали путем анализа основных биохимических показателей крови, характеризующих функцию печени (альбумин, общий белок, АСТ, АЛТ, ЩФ, мочевины, общий билирубин, глюкоза, фибриноген).

3.4.1. Морфометрические показатели печени животных разного возраста с частичной гепатэктомией после введения мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток

У животных с частичной гепатэктомией на 1 и 3 сутки после трансплантации ММСК не обнаружено эффекта от введенных клеток (таблицы 24, 25).

Таблица 24

Морфометрическая характеристика репаративных процессов в печени мышей на 1 сутки после частичной гепатэктомии

Морфометрические показатели	Значения показателей			
	Зрелые животные		Старые животные	
	NaCl	ММСК	NaCl	ММСК
Масса печени, г	0,64±0,05*	0,68±0,06*	0,82±0,07°	0,79±0,06°
Апоптотический индекс, ‰	0,90±0,06*	0,94±0,09*	1,08±0,15°	1,11±0,16°
Количество гепатоцитов с микроядрами, ‰	2,23±0,21	2,17±0,17	3,23±0,23	3,16±0,24
Митотический индекс, ‰	0,52±0,03	0,54±0,04	0,42±0,03°	0,43±0,4
Количество гепатоцитов на 1 мкм ²	1192,00±89,43*	1227,00±95,71*	1021,00±91,71°	1048,86±85,88°
Площадь гепатоцита (мкм ²)	340,20±24,43*	356,86±31,22*	360,70±30,80°	351,66±27,47°
Площадь цитоплазмы гепатоцита (мкм ²)	258,56±17,02*	271,31±24,16*	225,07±20,25	238,71±18,62
Площадь ядра гепатоцита (мкм ²)	81,64±7,45*	85,54±8,47*	77,59±6,53°	76,46±7,07°
Ядерно-цитоплазматический индекс	0,32±0,01*	0,32±0,04*	0,35±0,02°	0,32±0,02°
Количество двухъядерных гепатоцитов на 1 мм ²	334,31±12,30*	325,29±15,39	320,74±24,49°	333,60±31,80°

Примечание:

* p<0,05 с подгруппой сравнения зрелых мышей;

° p<0,05 с группой сравнения старых мышей.

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

Показатели	Значение			
	Зрелые животные		Старые животные	
	NaCl	ММСК	NaCl	ММСК
Масса печени, г	1,04±0,09*	1,11±0,10*	1,25±0,09°	1,42±0,10°
Апоптотический индекс, ‰	2,13±0,20*	1,96±0,19*	2,29±0,20°	2,16±0,17°
Количество гепатоцитов с микроядрами, ‰	3,37±0,26*	3,07±0,23*	5,11±0,44°	4,83±0,38°
Митотический индекс, ‰	8,1±0,60*	7,91±0,58*	2,81±0,27°	2,96±0,52°
Количество гепатоцитов на 1 мкм ²	1206,71±91,96*	1167,86±93,55*	996,43±76,65°	1020,14±98,12°
Площадь гепатоцита (мкм ²)	331,81±24,02*	343,71±22,61*	379,31±32,58°	387,04±37,04°
Площадь цитоплазмы гепатоцита (мкм ²)	243,64±19,25	237,63±15,94	261,57±24,08	269,76±23,42
Площадь ядра гепатоцита (мкм ²)	67,13±7,01	67,89±6,9*	76,01±8,56°	77,39±6,59°
Ядерно-цитоплазматический индекс	0,27±0,01*	0,29±0,01*	0,29±0,01°	0,29±0,01°
Количество двухъядерных гепатоцитов на 1 мм ²	380,97±10,15*	386,71±21,39*	343,43±25,80°	353,86±36,16°

Примечание:

* $p < 0,05$ с подгруппой сравнения зрелых мышей;

° $p < 0,05$ с группой сравнения старых мышей;

°° $p < 0,05$ с контрольной подгруппой старых мышей.

В опытных подгруппах зрелых и старых мышей отмечено увеличение массы печени на 7 сутки после частичной гепатэктомии. У зрелых животных это происходит за счет повышения митотической активности и угнетения запрограммированной клеточной гибели, тогда как у старых – за счет угнетения апоптоза. Также в обеих возрастных группах выявлено уменьшение количества гепатоцитов с микроядрами, что может говорить о снижении выраженности мутагенеза в клетках печени. У зрелых и старых лабораторных животных обнаружено повышение количества двуядерных гепатоцитов, увеличение

размеров ядра. Эти изменения привели к повышению ядерно-цитоплазматического индекса (таблица 26).

Таблица 26

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

Показатели	Значение			
	Зрелые		Старые	
	NaCl	ММСК	NaCl	ММСК
Масса печени, г	1,15±0,09*	1,53±0,12**	1,68±0,11°	2,01±0,16° °°
Апоптотический индекс, ‰	1,25±0,09*	0,94±0,07* **	1,81±0,17°	1,42±0,12° °°
Количество гепатоцитов с микроядрами, ‰	2,77±0,23*	2,21±0,16**	4,60±0,37°	3,73±0,26° °°
Митотический индекс, ‰	4,51±0,47*	5,76±0,49* **	1,50±0,10°	1,57±0,12°
Активность ферментов семейства PARP в клетках печени, MFI, усл. ед.	59,3±5,2*	80,6±7,5* **	40,1±3,8°	50,5±4,9° °°
Количество гепатоцитов на 1 мкм ²	1427,71±116,98	1485,14±116,20	1009,57±74,49°	980,86±97,59°
Площадь гепатоцита (мкм ²)	286,41±22,44	275,14±24,16	348,19±28,36°	352,31±33,73°
Площадь цитоплазмы гепатоцита (мкм ²)	223,03±17,97	204,37±22,80	227,13±15,37	224,73±19,86
Площадь ядра гепатоцита (мкм ²)	63,39±5,12*	76,63±4,92* **	72,97±5,91°	88,17±6,58° °°
Ядерно-цитоплазматический индекс	0,29±0,02*	0,38±0,02* **	0,32±0,02°	0,39±0,01° °°
Количество двухъядерных гепатоцитов на 1 мм ²	320,77±10,64*	393,90±23,23* **	325,74±22,52°	389,71±28,33° °°

Примечание:

* p<0,05 с подгруппой сравнения зрелых мышей;

** p<0,05 с контрольной подгруппой зрелых мышей;

° p<0,05 с группой сравнения старых мышей;

°° p<0,05 с контрольной подгруппой старых мышей.

Проведенные исследования продемонстрировали, что введение ММСК зрелым и старым лабораторным животным приводит к восстановлению массы печени. При этом механизмы восстановления массы разные. У зрелых животных введение ММСК приводит к повышению митотической активности и снижению

выраженности апоптоза. У старых животных выявлено угнетение запрограммированной клеточной гибели, но при этом митотический индекс не изменяется. В обеих возрастных группах отмечается уменьшение количества гепатоцитов с микроядрами, увеличение количества двуядерных гепатоцитов, повышение ядерно-цитоплазматического индекса.

3.4.2. Биохимические показатели крови животных разного возраста с частичной гепатэктомией после введения мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток

Анализ биохимических показателей крови мышей с частичной гепатэктомией на 1 сутки после трансплантации ММСК показал отсутствие достоверных отличий между данными контрольной и опытной подгрупп (таблица 27).

Таблица 27

Биохимические показатели крови на 1 сутки после частичной гепатэктомии

Показатели		Значение			
		Зрелые		Старые	
		NaCl	ММСК	NaCl	ММСК
Показатели белкового обмена	общий белок (г/л)	51,29±4,81*	55,20±4,71*	52,79±3,64°	57,56±4,68°
	альбумин (г/л)	20,54±1,89*	23,59±2,58*	18,77±1,46°	19,19±2,93°
	мочевина (ммоль/л)	3,79±0,41*	3,93±0,42*	4,40±0,34°	4,59±0,33°
Показатели цитоллиза	аспартатаминотрансфераза (Е/л)	416,79± 29,76*	380,33± 45,46*	462,80± 31,91°	446,44± 45,42°
	аланинаминотрансфераза (Е/л)	296,91± 22,64*	277,96± 22,36*	368,14± 30,68°	350,76± 35,49°
Показатель холестаза	щелочная фосфатаза (Е/л)	136,10± 4,66*	135,83± 9,20*	163,96± 30,48°	156,93± 25,31°
Глюкоза (ммоль/л)		4,01±0,53*	4,17±0,40*	3,84±0,32°	4,04±0,31°
Общий билирубин, (мкмоль/л)		19,84±2,85*	18,87±3,31*	17,79±1,56°	16,83±1,84°
Фибриноген (г/л)		2,93±0,22	3,00±0,23	3,47±0,21	3,51±0,24

Примечание:

* $p < 0,05$ с подгруппой сравнения зрелых мышей;

° $p < 0,05$ с группой сравнения старых мышей

У зрелых мышей с частичной гепатэктомией на третьи сутки после введения ММСК выявлено снижение показателей АСТ на 24,1 %, АЛТ на 24,8 %, ЩФ на 23,1%. У старых мышей введение клеток не привело к изменению биохимических показателей крови (таблица 28).

Биохимические показатели крови на 3 сутки после частичной гепатэктомии

Показатели		Значение			
		Зрелые		Старые	
		NaCl	ММСК	NaCl	ММСК
Показатели белкового обмена	общий белок (г/л)	50,03±4,82*	55,61±4,24*	47,76±4,48°	55,34±5,09°
	альбумин (г/л)	19,80±2,51*	21,60±3,14*	17,11±2,36°	17,87±2,51°
	мочевина (ммоль/л)	4,37±0,33*	4,59±0,36*	4,49±0,39°	4,60±0,51°
Показатели цитоллиза	аспартатаминотранс- фераза (Е/л)	209,53±13,85 *	158,99±14,38 * **	212,14±19,08 °	203,93±19,32 °
	аланинаминотранс- фераза (Е/л)	155,24±9,38 *	116,73±12,51 * **	211,50±18,06 °	200,39±18,59 °
Показатели холестаза	щелочная фосфатаза (Е/л)	106,67±10,45 *	82,0±7,26* **	130,37±25,94 °	121,07±13,86 °
Глюкоза (ммоль/л)		3,66±0,29*	4,20±0,46*	4,13±0,72°	4,40±0,34°
Общий билирубин, (мкмоль/л)		21,99±5,47*	21,29±2,36*	25,89±2,27°	24,20±2,06°
Фибриноген (г/л)		2,0±0,17*	2,11±0,18*	2,27±0,26°	2,49±0,24°

Примечание:

* $p < 0,05$ с подгруппой сравнения зрелых мышей;

** $p < 0,05$ с контрольной подгруппой зрелых мышей;

° $p < 0,05$ с группой сравнения старых мышей.

В результате исследования получено, что у мышей с частичной гепатэктомией введение ММСК приводит к снижению уровня ферментов, характеризующих цитоллиз гепатоцитов (АСТ, АЛТ), холестаза (щелочная фосфатаза). У зрелых животных эти показатели соответствовали данным подгруппы сравнения, тогда как у старых – оставались достоверно выше. Также у зрелых и старых лабораторных животных обнаружено повышение уровня фибриногена. У зрелых животных, в отличие от старых, выявлено восстановление уровня мочевины (таблица 29).

Получено, что трансплантация ММСК мышам с частичной гепатэктомией приводит к снижению активности ферментов цитоллиза: АСТ, АЛТ, щелочной фосфатазы. Одним из возможных механизмов снижения гибели клеток может быть формирование мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками межклеточных контактов и, таким образом, инициирование в клетках выработки белков теплового шока с молекулярной массой 70 кД (шапероны). Эти белки способны повышать устойчивость структурных белков цитоплазматической

мембраны [213, 297]. Следствием этого будет снижение проницаемости мембран клеток.

Таблица 29

Биохимические показатели крови на 7 сутки после частичной гепатэктомии

Показатели		Значение			
		Зрелые		Старые	
		NaCl	ММСК	NaCl	ММСК
Показатели белкового обмена	общий белок (г/л)	44,27±3,62*	49,63±2,80*	47,63±3,77°	52,77±3,85°
	альбумин (г/л)	20,59±1,90*	23,13±2,32*	17,13±1,42°	18,19±2,16°
	мочевина (ммоль/л)	4,57±0,46*	5,57±0,48**	4,54±0,35°	4,97±0,23°
Показатели цитоллиза	аспартатамино- трансфераза (Е/л)	153,86±16,96 *	103,57±12,42 **	183,59±16,79 °	123,8±9,29 ° °°
	аланинамино- трансфераза (Е/л)	137,10±16,29 *	86,34±7,52 **	175,01±12,82 *	127,34±10,12 ° °°
Показатели холестаза	щелочная фосфатаза (Е/л)	83,11±5,93 *	64,23±6,00 **	114,89±9,67 *	90,50±6,51 ° °°
Глюкоза (ммоль/л)		4,30±0,29*	4,91±0,51*	4,26±0,39°	4,53±0,37°
Общий билирубин (мкмоль/л)		15,41±2,76*	14,81±2,02*	17,14±2,21°	18,14±1,84°
Фибриноген (г/л)		2,20±0,23*	2,83±0,20**	2,44±0,16*	3,03±0,20° °°

Примечание:

* $p < 0,05$ с подгруппой сравнения зрелых мышей;

** $p < 0,05$ с контрольной подгруппой зрелых мышей;

° $p < 0,05$ с группой сравнения старых мышей;

°° $p < 0,05$ с контрольной подгруппой старых мышей.

Для изучения механизмов полученных эффектов при введении ММСК, производилась оценка содержания фактора роста гепатоцитов HGF в сыворотке крови. Получено, что на 7 сутки после частичной гепатэктомии происходит повышение уровня HGF на 135% у зрелых и на 97% у старых животных (рисунок). Трансплантация ММСК сопровождается еще большим повышением уровня HGF и у зрелых, но не приводит к достоверному увеличению у старых лабораторных животных (рисунок 34).

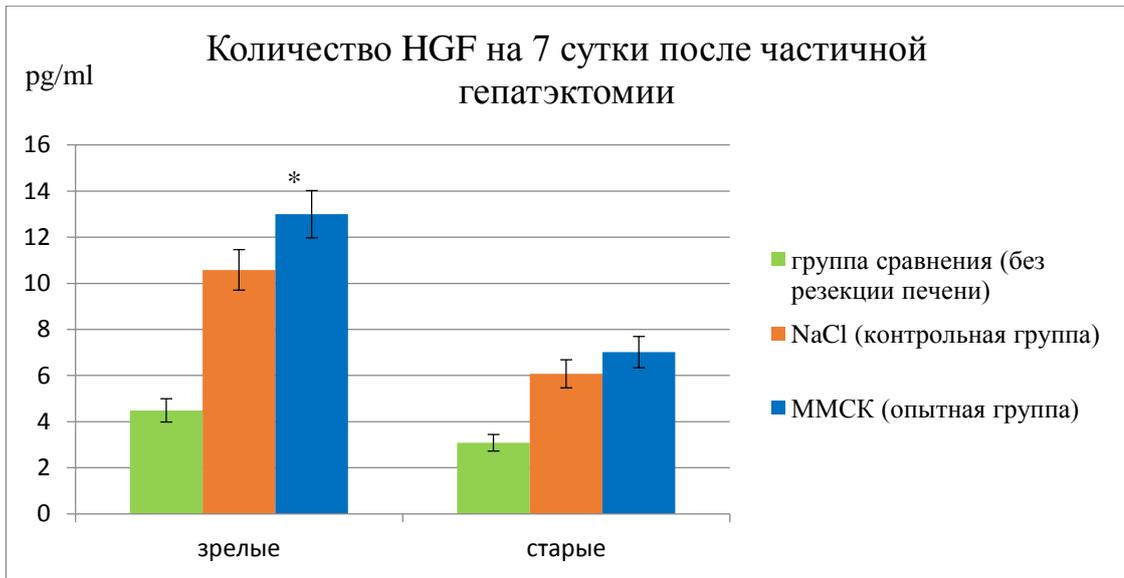


Рис. 34. Количество HGF у зрелых и старых животных на 7 сутки после частичной гепатэктомии.

3.5. Изучение влияния ММСК на морфофункциональное состояние печени мышей разного возраста при ее токсическом повреждении путем введения четыреххлористого углерода

3.5.1. Морфометрические показатели печени животных разного возраста после введения ММСК на фоне токсического повреждения печени

Введение тетрахлорметана сопровождалось появлением в печени зрелых и старых животных вакуольной дистрофии гепатоцитов, отека портальных трактов, ступенчатых и мостовидных некрозов гепатоцитов, выраженной моноцитарно-лимфоцитарной инфильтрации. Введение ММСК на 1 сутки развития токсического повреждения печени не привело к существенному изменению выраженности воспалительного процесса в печени мышей (таблица 30).

Таблица 30

Выраженность воспалительных явлений в печени на 1 сутки после внутрибрюшинного введения CCl_4

	Зрелые		Старые	
	NaCl	ММСК	NaCl	ММСК
Некрозы, баллы	6,0±0,52	5,9±0,62	7,2±0,63	6,9±0,71
Дистрофия гепатоцитов, баллы	3,1±0,24	3,0±0,28	3,9±0,28	3,7±0,32
Воспалительный инфильтрат, баллы	3,3±0,30	3,4±0,31	3,9±0,31	3,6±0,35
Итого ИВА:	12,4±1,13	12,3±1,95	15,0±1,20	14,2±13,46

Также по данным морфометрии на 1 сутки после введения четыреххлористого углерода не получено эффекта от введения ММСК (таблица 31).

Таблица 31

Морфометрическая характеристика репаративных процессов в печени мышей на 1 сутки после введения CCl_4

Показатели	Значение			
	Зрелые		Старые	
	NaCl	ММСК	NaCl	ММСК
Апоптотический индекс, ‰	4,87±0,36*	4,66±0,47*	5,64±0,45°	5,30±0,40°
Количество гепатоцитов с микроядрами, ‰	830,43±52,65*	807,43±56,65*	1035,86±92,41°	1018,00±99,14°
Митотический индекс, ‰	17,74±2,13*	18,97±1,54*	7,59±0,50°	7,26±0,58°
Количество гепатоцитов На 1 мкм ²	2060,71±121,10*	2010,0±109,43*	1475,29±127,18	1441,71±101,76
Площадь гепатоцита (мкм ²)	186,43±12,43*	180,79±11,98*	212,99±19,27°	223,09±18,39°
Площадь цитоплазмы гепатоцита (мкм ²)	132,83±11,71*	128,50±11,49*	151,34±15,72°	163,59±14,24°
Площадь ядра гепатоцита (мкм ²)	53,60±3,60	52,29±3,90	61,64±4,26	59,50±5,77
Ядерно-цитоплазматический индекс	0,41±0,04*	0,41±0,04*	0,41±0,03°	0,36±0,02°
Количество двухъядерных гепатоцитов на 1 мм ²	830,43±52,65*	807,43±56,65*	1035,86±92,41°	1018,00±99,14°

Примечание:

* $p < 0,05$ с подгруппой сравнения зрелых мышей;

** $p < 0,05$ с контрольной подгруппой зрелых мышей;

° $p < 0,05$ с группой сравнения старых мышей.

На 3 сутки после введения тетрахлорметана у зрелых мышей, которым были введены ММСК, отмечено снижение выраженности дистрофических изменений в гепатоцитах. Эти изменения не привели к уменьшению индекса воспалительной активности в печени (таблица 32). Эффект от введения ММСК получен и при изучении морфометрических показателей печени. Так у зрелых и старых животных, которым трансплантировали ММСК, отмечено угнетение запрограммированной клеточной гибели гепатоцитов, уменьшение количества гепатоцитов с микроядрами.

Выраженность воспалительных явлений в печени на 3 сутки после
внутрибрюшинного введения CCl_4

	Зрелые		Старые	
	NaCl	ММСК	NaCl	ММСК
Некрозы, баллы	5,6±0,54	5,0±0,41	6,8±0,57	6,3±0,55
Дистрофия гепатоцитов, баллы	2,9±0,22	2,3±0,20*	3,5±0,30	3,2±0,30
Воспалительный инфильтрат, баллы	3,1±0,21	2,7±0,22	3,7±0,30	3,4±0,15
Итого ИВА:	11,6±1,08	10,0±0,88	14,0±1,23	12,9±1,06

Примечание:

* $p < 0,05$ с контрольной подгруппой зрелых мышей.

У зрелых лабораторных животных, в отличие от старых, также выявлено повышение митотической активности гепатоцитов. Кроме того, в обеих возрастных группах отмечено увеличение площади ядра гепатоцитов, количества двуядерных гепатоцитов (таблица 33).

Морфометрическая характеристика репаративных процессов в печени мышей
на 3 сутки после введения CCl_4

Показатели	Значение			
	Зрелые		Старые	
	NaCl	ММСК	NaCl	ММСК
Апоптотический индекс, ‰	3,70±0,31*	2,63±0,28* **	4,34±0,39°	3,33±0,29° °°
Количество гепатоцитов с микроядрами, ‰	5,39±0,41*	3,87±0,26* **	8,43±0,62°	5,77±0,43° °°
Митотический индекс, ‰	15,20±1,20*	20,00±2,09* **	6,80±0,51°	6,96±0,45°
Количество гепатоцитов на 1 мкм ²	1902,86± 125,55*	2032,14± 144,69*	1431,29± 116,33	1476,71± 126,33
Площадь гепатоцита (мкм ²)	205,03±19,60*	197,59±15,79*	228,04±17,47°	235,00±20,80°
Площадь цитоплазмы гепатоцита (мкм ²)	151,76±17,96*	131,89±12,82*	157,50±15,14°	145,43±15,63°
Площадь ядра гепатоцита (мкм ²)	53,27±2,32	65,70±2,97* **	70,54±5,34°	89,57±6,11° °°
Ядерно-цитоплазматический индекс	0,35±0,03*	0,50±0,03* **	0,45±0,03°	0,62±0,04° °°
Количество двухъядерных гепатоцитов на 1 мм ²	474,43±46,08 *	647,43±51,39 * **	736,14±56,37 °	937,00±70,29 ° °°

Примечание:

* $p < 0,05$ с подгруппой сравнения зрелых мышей;

** $p < 0,05$ с контрольной подгруппой зрелых мышей;

° $p < 0,05$ с группой сравнения старых мышей;

°° $p < 0,05$ с контрольной подгруппой старых мышей.

Изучение морфологической картины печени зрелых мышей на 7 сутки после введения тетрахлорметана показало эффект от введения ММСК в виде снижения индекса воспалительной активности. Это произошло за счет уменьшения зон некроза и дистрофии гепатоцитов (таблица 34).

Таблица 34

Выраженность воспалительных явлений в печени на 7 сутки
после внутрибрюшинного введения CCl_4

	Зрелые животные		Старые животные	
	NaCl	ММСК	NaCl	ММСК
Некрозы, баллы	3,8±0,32	3,0±0,26*	4,6±0,41	4,0±0,30
Дистрофия гепатоцитов, баллы	2,0±0,17	1,6±0,15*	2,6±0,22	2,1±0,19°
Воспалительный инфильтрат, баллы	2,2±0,23	1,9±0,14	2,8±0,22	2,4±0,20
Итого ИВА:	8,0±0,81	6,5±0,59*	10,0±0,82	8,5±0,78

Примечание: * $p < 0,05$ с контрольной подгруппой зрелых мышей; ° $p < 0,05$ с контрольной подгруппой старых мышей.

На 7 сутки после внутрибрюшинного введения четыреххлористого углерода в опытной группе зрелых и старых мышей произошло увеличение площади ядер гепатоцитов. Это привело к увеличению ядерно-цитоплазматического индекса. Также на 7 сутки выявлено повышение митотического индекса, снижение выраженности апоптоза, увеличение количества двухъядерных гепатоцитов по сравнению с контрольной подгруппой. Анализируя количество цитогенетически измененных клеток, выявлено их снижение (таблица 35).

Морфофункциональная характеристика репаративных процессов в печени мышей
на 7 сутки после введения CCl_4

Показатели	Значение			
	Зрелые		Старые	
	NaCl	ММСК	NaCl	ММСК
Апоптотический индекс, ‰	3,74±0,31*	2,81±0,27* **	4,60±0,31°	3,53±0,34° °°
Количество гепатоцитов с микроядрами, ‰	5,46±0,43*	3,79±0,27* **	8,57±0,74°	5,60±0,49° °°
Митотический индекс, ‰	17,06±1,64*	22,51±1,79* **	7,37±0,40°	9,96±0,55° °°
Активность ферментов семейства PARP в клетках печени, MFI, усл.ед.	91,3±8,8*	131,4±12,0* **	52,2±4,7°	67,3±6,0° °°
Количество гепатоцитов На 1 мкм ²	1970,71±139,96*	1766,00±102,0*	1408,86±117,88	1267,29±116,10
Площадь гепатоцита (мкм ²)	204,71±16,27*	230,27±20,72	225,73±19,00°	275,29±21,53°°
Площадь цитоплазмы гепатоцита (мкм ²)	143,77±14,80*	150,24±16,25*	148,93±14,02°	169,06±13,71°
Площадь ядра гепатоцита (мкм ²)	60,94±4,68*	82,56±5,09* **	76,80±6,74°	106,23±8,13° °°
Ядерно-цитоплазматический индекс	0,43±0,04*	0,56±0,05* **	0,52±0,03°	0,63±0,05° °°
Количество двухъядерных гепатоцитов на 1 мм ²	388,57±30,94*	471,71±31,96* **	471,43±30,49°	556,14±43,80° °°

Примечание:

* $p < 0,05$ с подгруппой сравнения зрелых мышей;

** $p < 0,05$ с контрольной подгруппой зрелых мышей;

° $p < 0,05$ с группой сравнения старых мышей;

°° $p < 0,05$ с контрольной подгруппой старых мышей.

Полученные данные свидетельствуют о том, что введение ММСК, выделенных из плаценты, зрелым и старым мышам приводит к смещению соотношения между такими процессами, как пролиферация и запрограммированная гибель гепатоцитов в сторону активации пролиферации. Также в обеих возрастных группах происходит повышение количества двухъядерных гепатоцитов, увеличение ядерно-

цитоплазматического индекса. Введение ММСК при токсическом повреждении печени приводит к снижению количества гепатоцитов с микроядрами у зрелых и старых лабораторных животных, активации ферментов репарации семейства PARP в обеих изучаемых возрастных группах.

3.5.2. Биохимические показатели крови животных разного возраста с токсическим повреждением печени после трансплантации ММСК

Трансплантация ММСК животным с токсическим повреждением печени на 1 сутки после введения CCl_4 не сопровождается изменением биохимических показателей крови (таблица 36).

Таблица 36

Биохимические показатели крови на 1 сутки
после внутрибрюшинного введения CCl_4

Показатели		Значение			
		Зрелые		Старые	
		NaCl	ММСК	NaCl	ММСК
Показатели белкового обмена	общий белок (г/л)	60,15±5,68	62,08±5,45	64,54±5,72	66,24±4,98
	альбумин (г/л)	25,71±2,19	26,40±2,73	22,24±2,43	23,04±2,12
	мочевина (ммоль/л)	5,11±0,34	5,31±0,41	5,79±0,47	5,60±0,83
Показатели цитоллиза	аспартатаминотранс- фераза (Е/л)	215,37± 11,66 *	212,44± 12,56*	235,99± 21,06 °	239,14± 24,00 °
	аланинаминотранс- фераза (Е/л)	210,13± 12,34 *	203,76± 11,52*	249,95± 16,59 °	254,94± 17,80 °
Показатель холестаза	щелочная фосфатаза (Е/л)	122,89± 9,21 *	120,68± 9,79*	152,08± 11,73 °	144,95± 12,30 °
Глюкоза (ммоль/л)		4,28±0,40 *	4,41±0,36*	3,81±0,33 °	3,91±0,29 °
Общий билирубин, (мкмоль/л)		15,14±1,09 *	14,81±0,59*	17,24±1,54 °	17,73±1,58 °
Фибриноген (г/л)		2,87±0,20	2,97±0,20	3,50±0,26	3,58±0,23

Примечание:

* $p < 0,05$ с подгруппой сравнения зрелых мышей;

° $p < 0,05$ с группой сравнения старых мышей.

Исследование биохимических показателей крови мышей с токсическим повреждением печени на 3 сутки после трансплантации ММСК показало снижение содержания ферментов, характеризующих цитоллиз гепатоцитов: АСТ, АЛТ (таблица 37).

Биохимические показатели крови на 3 сутки
после внутрибрюшинного введения CCl_4

Показатели		Значение			
		Зрелые		Старые	
		NaCl	ММСК	NaCl	ММСК
Показатели белкового обмена	общий белок (г/л)	48,96±3,39*	51,85±4,98*	50,14±4,04°	51,56±3,74°
	альбумин (г/л)	20,51±1,59*	22,05±2,03*	15,86±1,71°	16,53±1,50°
	мочевина (ммоль/л)	5,33±0,48	5,63±0,45	6,08±0,53	5,54±0,44
Показатели цитоллиза	аспартатаминотранс- фераза (Е/л)	170,55± 11,13*	134,21± 12,03* **	180,85± 11,76°	141,06± 15,63° °°
	аланинаминотранс- фераза (Е/л)	166,46± 10,36*	121,25± 7,76* **	210,95± 12,18°	159,21± 12,62° °°
Показатель холестаза	щелочная фосфатаза (Е/л)	106,73± 9,58*	97,0± 9,10*	125,46± 10,07°	119,09± 10,74°
Глюкоза (ммоль/л)		4,25±0,36*	4,35±0,48*	4,28±0,34°	4,40±0,35°
Общий билирубин, (мкмоль/л)		11,85±0,90*	11,30±0,85*	14,61±1,09°	13,35±1,28°
Фибриноген (г/л)		2,34±0,18*	2,49±0,21*	2,49±0,19°	2,63±0,20°

Примечание:

* $p < 0,05$ с подгруппой сравнения зрелых мышей;

** $p < 0,05$ с контрольной подгруппой зрелых мышей;

° $p < 0,05$ с группой сравнения старых мышей;

°° $p < 0,05$ с контрольной подгруппой старых мышей.

У зрелых и старых животных с токсическим повреждением печени на 7 сутки после трансплантации ММСК отмечено снижение уровня АСТ до значений подгруппы сравнения, снижение уровня АЛТ. Кроме того, в обеих возрастных группах выявлено повышение уровня фибриногена. У зрелых мышей, в отличие от старых, также произошло снижение активности щелочной фосфатазы и восстановление белковосинтетической функции печени – повышение уровня общего белка и альбумина (таблица 38).

Биохимические показатели крови на 7 сутки
после внутрибрюшинного введения CCl₄

Показатели		Значение			
		Зрелые		Старые	
		NaCl	ММСК	NaCl	ММСК
Показатели белкового обмена	общий белок (г/л)	51,18±4,58*	66,56±5,91**	54,05±4,80°	57,39±4,52°
	альбумин (г/л)	22,74±1,86*	30,57±2,52**	17,06±1,71°	17,81±1,92°
	мочевина (ммоль/л)	6,41±0,49	6,16±0,53	6,53±0,60	6,26±0,53
Показатели цитоллиза	аспартатаминотранс- фераза (Е/л)	138,45± 9,29*	98,59± 8,78**	143,78± 10,28°	107,93± 10,73°°
	аланинаминотранс- фераза (Е/л)	154,50± 9,85*	106,94± 9,39* **	177,60± 12,98°	125,81± 9,82° °°
Показатель холестаза	щелочная фосфатаза (Е/л)	91,20± 7,98*	66,26± 6,99**	103,04± 9,10°	94,58± 7,12°
Глюкоза (ммоль/л)		5,90±0,50	6,46±0,45	4,51±0,44°	4,55±0,38°
Общий билирубин (мкмоль/л)		11,89±0,67*	11,59±0,64*	14,06±1,34°	13,76±1,18°
Фибриноген (г/л)		2,37±0,20*	2,91±0,21**	2,50±0,17°	3,03±0,22° °°

Примечание:

* p<0,05 с подгруппой сравнения зрелых мышей;

** p<0,05 с контрольной подгруппой зрелых мышей;

° p<0,05 с группой сравнения старых мышей;

°° p<0,05 с контрольной подгруппой старых мышей.

Проведенные исследования показали, что введение ММСК животным с токсическим повреждением печени приводит к снижению активности ферментов цитоллиза (АСТ, АЛТ) и холестаза – щелочной фосфатазы. Этот эффект можно объяснить способностью ММСК вырабатывать противовоспалительные цитокины. У зрелых животных введение ММСК способствует восстановлению белкового обмена. Выявленный эффект можно объяснить способностью ММСК к синтезу SCF-stem cell factor – фактора стволовых клеток. Этот фактор, связываясь с рецептором c-KIT (CD 117) на поверхности перисинусоидальных клеток печени, может способствовать их пролиферации и дифференцировке в гепатоциты [130, 182, 199]. При старении происходит снижение способности стволовых клеток к дифференцировке, снижается их пролиферативный потенциал [112, 252], поэтому у старых лабораторных животных не произошло восстановления белкового обмена.

Заключение по 3 главе

Проведенные исследования позволили выявить различия в морфофункциональных показателях печени зрелых и старых лабораторных животных. При старении отмечается увеличение размеров гепатоцитов, увеличивается количество двуядерных гепатоцитов, снижается митотическая активность и повышается уровень запрограммированной клеточной гибели. В крови старых лабораторных животных выявлено снижение содержания альбумина, повышение активности АЛТ, ЩФ, повышение количества билирубина по сравнению со зрелыми животными.

В условиях частичной гепатэктомии и у зрелых, и у старых животных отмечается снижение количества гепатоцитов на единицу площади, увеличение площади их ядер, ЯЦИ, повышение количества двуядерных клеток, митотической активности, запрограммированной клеточной гибели. Также увеличивается количество гепатоцитов с микроядрами. Возрастные особенности заключаются в том, что у зрелых животных размер гепатоцитов и площадь цитоплазмы увеличиваются уже с первых суток, а у старых позднее – лишь на 3-и сутки после частичной гепатэктомии. У зрелых животных отмечается более выраженная активация митотической активности. Частичная гепатэктомия в обеих возрастных группах сопровождается снижением уровня общего белка, альбуминов, мочевины, глюкозы, повышением общего билирубина, активности АСТ, АЛТ и ЩФ.

Введение тетрахлорметана сопровождается появлением в печени зон ступенчатых и мостовидных некрозов, дистрофически измененных гепатоцитов, выраженной лейкоцитарной инфильтрации. У старых животных эти изменения более выражены по сравнению со зрелыми животными. Это может быть связано со снижением активности антиоксидантной системы с возрастом. Повреждающее же действие тетрахлорметана связано с образованием в процессе метаболизма свободных радикалов, которые стимулируют реакции ПОЛ, повреждают клеточные

мембраны. При повреждении мембран лизосом в цитоплазму поступают протеолитические ферменты, усугубляющие повреждение [21, 67, 156, 207, 233].

В условиях токсического повреждения печени независимо от возраста животного отмечается уменьшение размеров гепатоцитов за счет уменьшения площади цитоплазмы и, как результат, увеличивается ЯЦИ. Также отмечается значительное увеличение числа двухъядерных клеток, повышение МИ и АИ. В условиях токсического повреждения печени возрастные особенности проявляются в том, что у зрелых животных отмечается увеличение количества гепатоцитов на единицу площади, а у старых нет. У старых животных происходит более выраженное повышение уровня апоптоза и менее значимое повышение митотической активности, чем у зрелых животных. Также при токсическом повреждении печени независимо от возраста в крови снижается количество общего белка, альбуминов, фибриногена, уровень глюкозы, повышаются билирубин, активность АСТ, АЛТ и ЩФ. Возрастные особенности выявляются в более высокой активности АЛТ у старых животных и нормализации уровня глюкозы у зрелых животных на 7-е сутки после введения четыреххлористого углерода.

Проведенные исследования также позволили оценить миграцию различных видов трансплантируемых клеток (ММСК, ММСК и ГСК, ММСК и ПКП) при разных способах введения: в хвостовую латеральную вену, портальную вену, печеночную артерию, интраперитонеально в физиологических условиях и в условиях острой печеночной недостаточности, вызванной резекцией печени и введением четыреххлористого углерода. Эти исследования проведены на зрелых и старых лабораторных животных.

Получено, что в физиологических условиях при введении меченых клеток в хвостовую вену, печеночную артерию, портальную вену зрелых и старых лабораторных животных содержание меченых клеток в печени достоверно не

отличается. При внутрибрюшинном введении содержание меченых клеток в печени существенно меньше, чем при других изучаемых путях введения.

В условиях повреждения печени установлены схожие изменения в содержании меченых клеток в печени при разных путях введения. Получено, что трансплантация окрашенных флуорохромами клеток в хвостовую латеральную вену, печеночную артерию, а также портальную вену приводит к большему их содержанию в печени, чем при внутрибрюшинном пути введения.

Также следует отметить, что количество меченых клеток в печени при всех изучаемых путях введения в условиях патологии печени оказалось существенно больше, чем их содержание в печени в физиологических условиях. Это свидетельствует о способности трансплантированных клеток к направленной миграции в ткани, подвергшиеся наибольшему повреждению.

Усиление хоуминга при патологии печени может быть обусловлено способностью стромы поврежденного органа повышать выработку хемоаттрактанта (SDF - stromal cell-derived factor 1) для клеток, которые имеют его рецепторы на мембране [89, 92, 115, 218]. На поверхности трансплантируемых клеток (ММСК, ГСК ПКП) локализованы трансмембранные хемокиновые рецепторы 4 типа (CXCR4, CD184). Таким образом, данный хемоаттрактант взаимодействует с хемокиновыми рецепторами, обеспечивая направленное движение трансплантированных клеток в печень.

Изучение распределения клеток при внутрибрюшинном способе введения, показало, что данный способ является низкоэффективным для доставки клеток в печень. Остальные изучаемые пути введения клеток: в хвостовую вену, в портальную вену, печеночную артерию не показали достоверных различий в количестве мигрировавших в печень клеток. Это определило выбор способа трансплантации клеток данного исследования – в хвостовую вену, так как этот путь введения не сопряжен с хирургическим вмешательством.

В результате проведенного исследования выяснено, что введение ММСК зрелым и старым лабораторным животным не влияет на физиологическую регенерацию печени, но оказывает влияние на репаративную регенерацию печени после частичной гепатэктомии. Об этом свидетельствует восстановление массы органа после введения клеток, изменение морфометрических показателей печени. При этом механизмы восстановления в зрелом и старом организме имеют некоторые отличия. У зрелых лабораторных животных восстановление массы органа достигается за счет увеличения митотической активности гепатоцитов и угнетения запрограммированной их гибели, тогда как у старых животных – за счет снижения апоптоза гепатоцитов (рисунок 35).

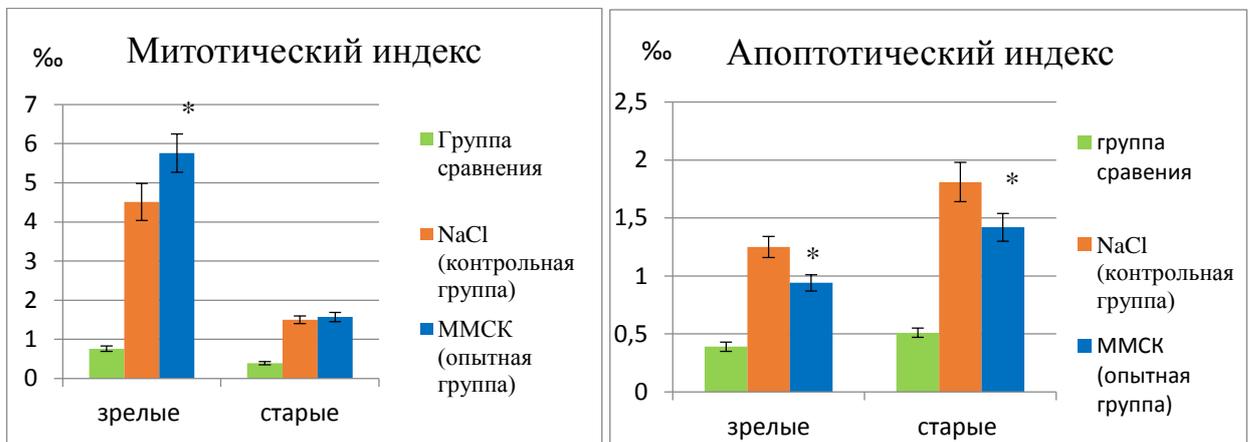


Рис. 35. Показатели реенерации гепатоцитов зрелых и старых лабораторных животных на 7 сутки после частичной гепатэктомии

Повышение митотической активности у зрелых животных соответствует полученным в ходе исследования данным по оценке уровне HGF. Известно, что фактор роста гепатоцитов является митогеном для гепатоцитов [18, 55]. Повышение его уровня после трансплантации ММСК и привело к активации митотической активности гепатоцитов. У старых животных не выявлено достоверных изменений HGF после введения ММСК и эффекта на пролиферативную активность не обнаружено.

Ингибирование апоптоза достигается не за счет прямого антиапоптогенного действия, а косвенно, через активацию ферментов репарации. Об этом свидетельствует существенное повышение уровня поли(АДФ-рибоза)полимера в клетках печени животных опытной группы.

В обеих возрастных группах выявлено повышение количества двуядерных гепатоцитов, что является результатом полиплоидизирующих митозов, энергетически более выгодных для клетки.

Изменения морфометрических показателей печени при введении ММСК сопровождаются изменением биохимических показателей крови – происходит снижение активности ферментов (АСТ, АЛТ, щелочной фосфатазы) (рисунок 36). При этом у зрелых животных коррекция данных показателей на фоне трансплантации плацентарных ММСК отмечается уже на 3 сутки после частичной гепатэктомии, тогда как у старых животных этот эффект выявлен лишь на 7 сутки. Снижение в крови уровня ферментов цитолиза при резекции печени можно рассматривать как результат уменьшающейся воспалительной реакции в печени, что может быть связано со способностью ММСК к выработке противовоспалительных факторов – ИЛ-10, трансформирующего фактора роста (TGF- β) [110, 139].

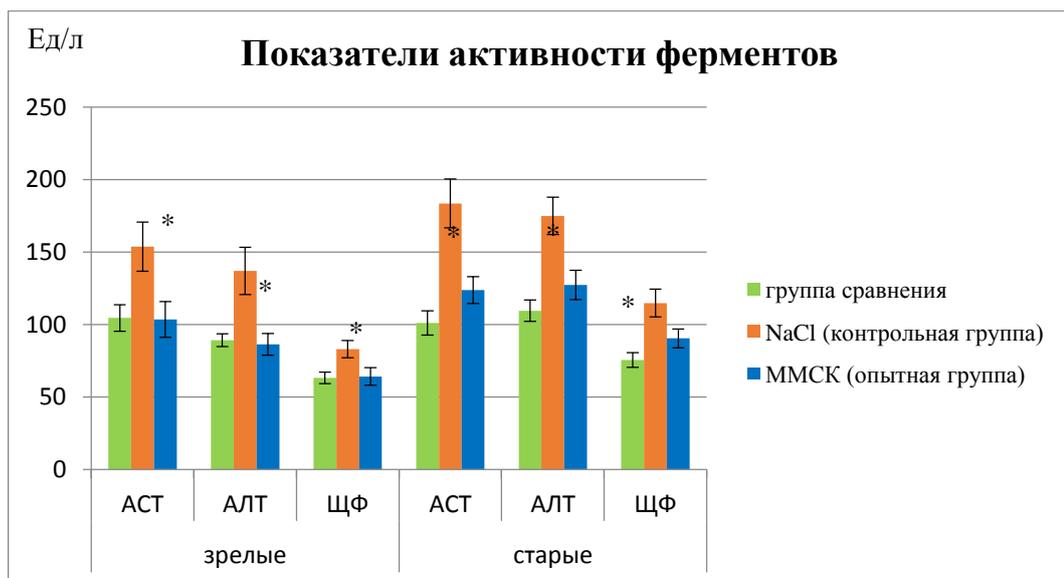


Рис. 36. Показатели активности ферментов на 7 сутки после частичной гепатэктомии

Проведенные исследования также свидетельствуют о способности зрелых и старых лабораторных животных отвечать на трансплантацию ММСК в условиях токсического повреждения печени. Так в печени животных опытных подгрупп отмечено снижение индекса воспалительной активности по сравнению с контрольными подгруппами. Это происходит в результате снижения под влиянием ММСК зон некроза и дистрофических изменений гепатоцитов. Изменения морфологической картины печени сопровождаются изменениями морфометрических показателей. У зрелых и старых животных введение ММСК на фоне токсического повреждения приводит к повышению митотической активности клеток и ингибированию апоптоза (рисунок 37).

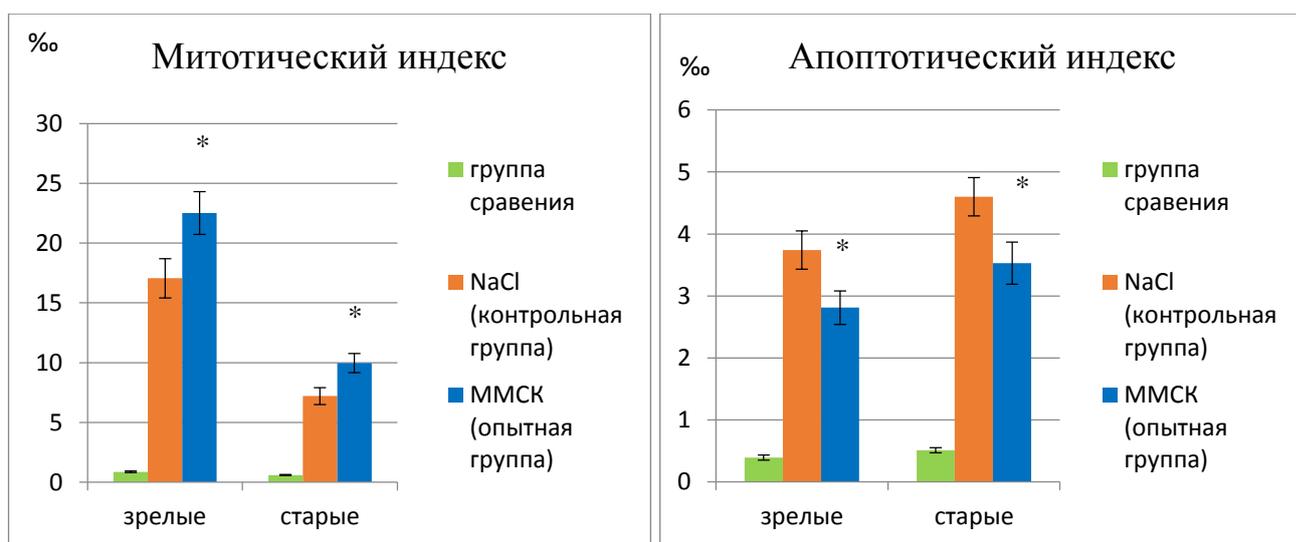


Рис. 37. Показатели регенерации печени зрелых и старых лабораторных животных на 7 сутки после введения CCl_4 .

Ингибирование апоптоза при введении ММСК можно объяснить способностью этих клеток индуцировать в клетках печени выработку белков теплового шока [216, 297], что обеспечивает защиту ферментов репарации (белки репарации семейства PARP) от разрушения и приводит к исправлению нарушений в молекуле ДНК. В настоящем исследовании установлено повышение количества поли(АДФ-рибоза) полимера в клетках печени. Это свидетельствует о повышении

активности ферментов репарации повреждений ДНК семейства PARP. Уменьшение количества мутаций в молекуле ДНК способствует снижению активности иницирующих, и, как следствие, эффекторных каспаз, что приводит к ингибированию апоптоза.

Выявлено, что введение ММСК приводит к снижению активности ферментов цитолиза у зрелых и старых лабораторных животных (рисунок 38).

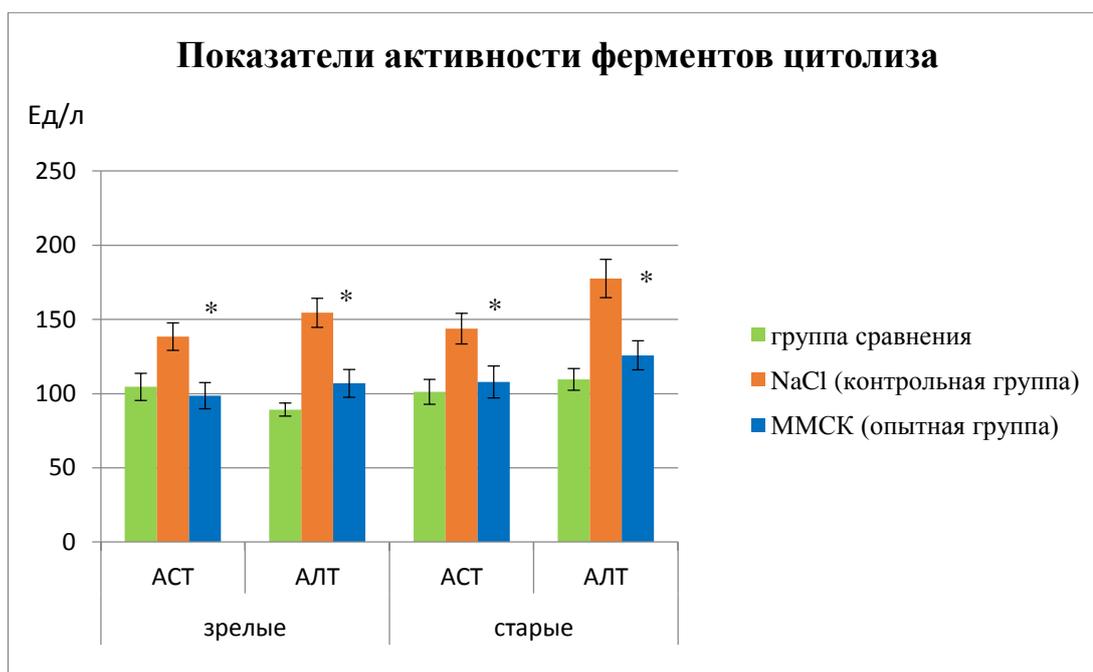


Рис. 38. Показатели активности ферментов крови зрелых и старых лабораторных животных на 7 сутки после введения CCl_4 .

У зрелых лабораторных животных введение ММСК также приводит к восстановлению белоксинтетической функции печени. У старых животных этот эффект не обнаружен (рисунок 39).

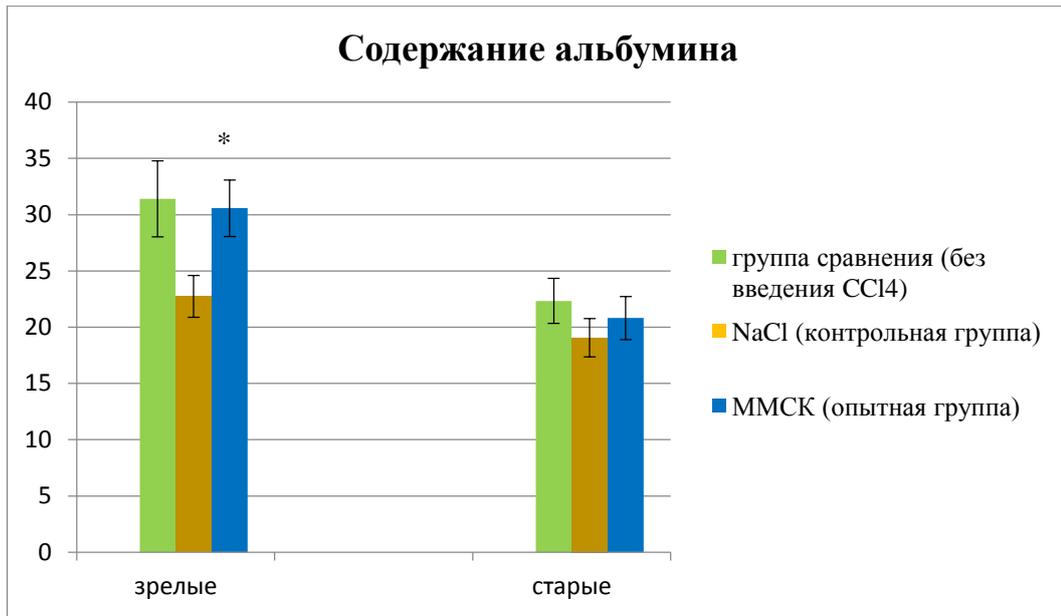


Рис. 39. Показатели белкового обмена зрелых и старых лабораторных животных на 7 сутки после введения CCl₄.

**ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ СОЧЕТАННОГО ВВЕДЕНИЯ
МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ
И ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА
МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ
РАЗНОГО ВОЗРАСТА В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ
И ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ ПЕЧЕНИ**

4.1. Влияние котрансплантации ММСК и ГСК на морфофункциональное состояние печени животных разного возраста в физиологических условиях

Сочетанное введение ММСК и ГСК животным без патологии печени не привело к изменению ее морфометрических показателей (таблица 39, 40, 41).

Таблица 39

Влияние котрансплантации ММСК и ГСК на морфометрические показатели
печени на 1 сутки после введения клеток

Показатели	Значение			
	Зрелые		Старые	
	NaCl	ММСК+ГСК	NaCl	ММСК+ГСК
Масса печени, г	1,80±0,13	1,83±0,14	2,21±0,17	2,18±0,18
Апоптотический индекс, ‰	0,41±0,05	0,42±0,04	0,51±0,04	0,50±0,05
Количество гепатоцитов с микроядрами, ‰	2,20±0,17	2,24±0,18	3,20±0,20	3,13±0,26
Митотический индекс, ‰	0,48±0,07	0,46±0,04	0,40±0,05	0,41±0,03
Количество гепатоцитов На 1 мкм ²	1567,57± 102,90	1521,0± 104,0	1323,14± 111,31	1359,14± 119,65
Площадь гепатоцита (мкм ²)	264,90±6,60	249,23±22,86	297,10±20,77	300,39±18,64
Площадь цитоплазмы гепатоцита (мкм ²)	214,33±10,33	206,20±24,43	239,5±24,74	240,63±15,05
Площадь ядра гепатоцита (мкм ²)	50,57±3,80	53,84±4,25	57,60±3,97	59,76±4,62
Ядерно-цитоплазматический индекс	0,24±0,03	0,26±0,01	0,25±0,04	0,25±0,02
Количество двухъядерных гепатоцитов на 1 мм ²	233,43±12,2	238,29±16,53	261,06±8,61	266,06±9,58

Влияние котрансплантации ММСК и ГСК на морфометрические показатели
печени на 3 сутки после введения клеток

Показатели	Значение			
	Зрелые		Старые	
	NaCl	ММСК+ГСК	NaCl	ММСК+ГСК
Масса печени, г	1,81±0,15	1,84±0,16	2,22±0,17	2,25±0,15
Апоптотический индекс, ‰	0,43±0,04	0,41±0,05	0,49±0,04	0,53±0,06
Количество гепатоцитов с микроядрами, ‰	2,17±0,17	2,23±0,17	3,21±0,22	3,11±0,19
Митотический индекс, ‰	0,47±0,06	0,47±0,04	0,39±0,04	0,40±0,04
Количество гепатоцитов на 1 мкм ²	1525,57± 101,06	1517,57± 105,78	1301,14± 124,98	1334,57± 128,81
Площадь гепатоцита (мкм ²)	267,54±6,38	273,63±14,94	310,77±13,46	315,76±17,63
Площадь цитоплазмы гепатоцита (мкм ²)	219,14±7,12	223,50±11,57	252,16±15,02	255,91±14,27
Площадь ядра гепатоцита (мкм ²)	48,40±3,57	50,13±3,37	58,61±3,61	59,84±4,39
Ядерно-цитоплазматический индекс	0,22±0,02	0,22±0,01	0,23±0,03	0,23±0,01
Количество двухъядерных гепатоцитов на 1 мм ²	239,86±17,02	239,86±17,02	259,66±10,65	262,84±11,05

Таблица 41

Влияние котрансплантации ММСК и ГСК на морфофункциональное состояние
печени на 7 сутки после введения клеток

Показатели	Значение			
	Зрелые		Старые	
	NaCl	ММСК+ГСК	NaCl	ММСК+ГСК
Масса печени, г	1,76±0,13	1,73±0,13	2,18±0,11	2,24±0,15
Апоптотический индекс, ‰	0,39±0,03	0,44±0,05	0,51±0,04	0,52±0,06
Количество гепатоцитов с микроядрами, ‰	2,10±0,17	2,19±0,19	3,19±0,21	3,26±0,22
Митотический индекс, ‰	0,50±0,06	0,51±0,04	0,38±0,05	0,39±0,04
Активность ферментов семейства PARP в клетках печени, MFI, усл.ед.	45,2±4,1	43,6±4,0	30,4±2,8	32,0±3,1
Число гепатоцитов, (на 1 мкм ²)	1538,14± 103,59	1511,0± 101,86	1296,29± 119,29	1368,0± 122,14
Площадь гепатоцита (мкм ²)	264,67±5,86	269,57±16,37	293,69±12,08	306,70±15,80
Площадь цитоплазмы гепатоцита (мкм ²)	214,21±8,10	217,43±10,49	234,27±14,61	232,97±13,73
Площадь ядра гепатоцита (мкм ²)	50,46±3,29	52,14±5,88	59,41±2,73	62,44±4,71
Ядерно-цитоплазматический индекс	0,24±0,02	0,24±0,02	0,26±0,03	0,27±0,04
Количество двухъядерных гепатоцитов на 1 мм ²	237,29±8,24	250,29	265,71±11,02	260,13±11,69

Полученные результаты показали, что сочетанная трансплантация ММСК и ГСК не приводит к изменению показателей, характеризующих морфофункциональное состояние печени в обеих изучаемых возрастных группах.

При анализе биохимических показателей крови на 1, 3, 7 сутки после сочетанного введения ММСК и ГСК достоверных различий с подгруппами сравнения не обнаружено (таблица 42, таблица 43, таблица 44).

Таблица 42

Биохимические показатели крови на 1 сутки
после котрансплантации ММСК и ГСК

Показатели		Значение			
		Зрелые		Старые	
		NaCl	ММСК+ГСК	NaCl	ММСК+ГСК
Показатели белкового обмена	общий белок (г/л)	69,37±3,20	67,40±4,71	73,39±4,42	76,61±4,53
	альбумин (г/л)	30,03±2,83	28,54±2,52	23,76±2,21	24,53±3,09
	мочевина (ммоль/л)	5,76±1,28	5,60±0,57	6,20±0,43	6,27±0,55
Показатели цитоллиза	аспартатаминотранс- фераза (Е/л)	98,53±8,42	103,27±6,08	102,73±7,83	101,41±8,24
	аланинаминотранс- фераза (Е/л)	82,80±5,11	86,36±3,98	104,87±7,19	106,77±9,12
Показатель холестаза	щелочная фосфатаза (Е/л)	67,37±4,03	64,16±3,09	78,61±5,82	77,50±4,30
Глюкоза (ммоль/л)		6,10±0,57	6,17±0,40	5,93±0,36	6,03±0,54
Общий билирубин (мкмоль/л)		9,76±1,15	10,04±1,16	12,07±0,46	10,13±0,89
Фибриноген (г/л)		3,20±0,23	3,44±0,24	3,80±0,23	3,91±0,30

Биохимические показатели крови на 3 сутки после
котрансплантации ММСК и ГСК

Показатели		Значение			
		Зрелые		Старые	
		NaCl	ММСК+ГСК	NaCl	ММСК+ГСК
Показатели белкового обмена	общий белок (г/л)	68,31±3,93	68,70±4,26	73,07±4,56	75,01±3,53
	альбумин (г/л)	30,84±4,25	32,73±4,49	24,29±1,93	24,66±2,73
	мочевина (ммоль/л)	6,21±0,87	6,36±0,74	6,46±0,67	6,54±0,51
Показатели цитоллиза	аспартатаминотранс- фераза (Е/л)	97,26±8,47	100,39±9,50	102,39±9,52	105,37±10,32
	аланинаминотранс- фераза (Е/л)	81,13±8,66	83,49±7,41	98,59±7,38	99,20±8,29
Показатель холестаза	щелочная фосфатаза (Е/л)	66,34±5,24	69,04±6,57	78,74±6,04	82,00±5,46
Глюкоза (ммоль/л)		5,73±0,69	5,91±0,56	5,89±0,41	5,99±0,53
Общий билирубин (мкмоль/л)		8,90±1,14	9,27±0,71	14,04±0,41	13,16±0,79
Фибриноген (г/л)		3,27±0,18	3,29±0,22	3,93±0,29	3,84±0,31

Таблица 44

Биохимические показатели крови на 7 сутки после котрансплантации ММСК и
ГСК

Показатели		Значение			
		Зрелые		Старые	
		NaCl	ММСК+ГСК	NaCl	ММСК+ГСК
Показатели белкового обмена	общий белок (г/л)	66,46±4,36	70,30±3,09	72,24±4,32	74,36±2,69
	альбумин (г/л)	31,41±3,38	30,21±2,53	22,34±1,99	22,87±1,54
	мочевина (ммоль/л)	6,11±0,61	5,73±0,43	6,27±0,65	6,19±0,50
Показатели цитоллиза	аспартатаминотранс- фераза (Е/л)	104,56±9,07	97,60±8,43	101,19±8,41	103,66±7,69
	аланинаминотранс- фераза (Е/л)	89,23±4,43	86,86±6,13	109,57±7,36	102,39±6,36
Показатель холестаза	щелочная фосфатаза (Е/л)	63,30±4,00	66,07±5,80	75,56±5,11	74,26±5,85
Глюкоза (ммоль/л)		6,44±0,62	6,00±0,46	5,79±0,44	5,67±0,42
Общий билирубин (мкмоль/л)		9,37±0,65	9,21±0,70	13,13±0,62	12,16±0,53
Фибриноген (г/л)		3,20±0,23	3,13±0,26	3,80±0,26	3,86±0,22

Таким образом, сочетанное введение двух видов клеток: ММСК и ГСК зрелым и старым лабораторным животным без повреждения печени не приводит к изменению биохимических показателей крови.

4.2. Влияние котрансплантации ММСК и ГСК на морфофункциональное состояние печени животных разного возраста после частичной гепатэктомии

4.2.1. Морфометрические показатели печени животных разного возраста с частичной гепатэктомией после сочетанного введения ММСК и ГСК

Проведение сочетанной трансплантации ММСК и ГСК животным с частичной гепатэктомией не сопровождалось изменением морфометрических показателей печени на 1 сутки после введения клеток (таблица 45).

Таблица 45

Морфометрическая характеристика репаративных процессов в печени мышей на 1 сутки после частичной гепатэктомии

Показатели	Значение			
	Зрелые		Старые	
	NaCl	ММСК+ГСК	NaCl	ММСК+ГСК
Масса печени, г	0,64±0,05*	0,67±0,06*	0,82±0,07°	0,90±0,08°
Апоптотический индекс, ‰	0,90±0,06*	0,83±0,08*	1,08±0,15°	1,00±0,20°
Количество гепатоцитов с микроядрами, ‰	2,23±0,21	2,17±0,18	3,23±0,23	3,16±0,21
Митотический индекс, ‰	0,52±0,03	0,50±0,05	0,42±0,03	0,43±0,03
Количество гепатоцитов на 1 мкм ²	1192,0±89,43*	1214,43±110,94*	1021,00±91,71*	1055,43±98,49*
Площадь гепатоцита (мкм ²)	340,20±24,43*	353,14±34,98*	360,70±30,80°	368,97±35,28°
Площадь цитоплазмы гепатоцита (мкм ²)	258,56±17,02*	274,34±27,09*	225,07±20,25	241,20±19,94
Площадь ядра гепатоцита (мкм ²)	81,64±7,45*	78,80±7,89*	77,59±6,53°	73,26±5,47°
Ядерно-цитоплазматический индекс	0,32±0,01*	0,29±0,01*	0,35±0,01°	0,31±0,05°
Количество двухъядерных гепатоцитов на 1 мм ²	334,31±12,30*	339,43±14,94*	320,74±24,49°	324,77±24,91°

Примечание:

p<0,05 * с подгруппой сравнения зрелых животных;
p<0,05 ° с подгруппой сравнения старых животных.

На 3 сутки после проведения котрансплантации ММСК и ГСК животным с частичной гепатэктомией при анализе морфометрических показателей печени выявлено снижение апоптотического индекса и у зрелых, и у старых животных. Выявлены возрастные особенности: у зрелых лабораторных животных, в отличие от старых, произошло повышение количества двуядерных клеток на 24,2%, увеличение площади ядра гепатоцитов на 25,1%, что привело к повышению ЯЦИ на 20,0%, (таблица 46).

Таблица 46

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

Показатели	Значение			
	Зрелые		Старые	
	NaCl	ММСК-ГСК	NaCl	ММСК-ГСК
Масса печени, г	1,04±0,09*	1,12±0,12*	1,25±0,09°	1,35±0,12°
Апоптотический индекс, ‰	2,13±0,20*	1,59±0,13* **	2,29±0,20°	1,81±0,15° °°
Количество гепатоцитов с микроядрами, ‰	3,37±0,26*	3,10±0,23*	5,11±0,44°	4,64±0,30°
Митотический индекс, ‰	8,1±0,60 *	8,2±0,49 *	2,81±0,27°	2,98±0,39°
Количество гепатоцитов на 1 мкм ²	1206,71±91,96*	1146,29±106,33*	996,43±6,65*	957,43±86,78*
Площадь гепатоцита (мкм ²)	331,81±24,02 *	338,0±20,57*	379,31±32,58°	372,47±32,68°
Площадь цитоплазмы гепатоцита (мкм ²)	243,64±19,25	254,0±12,29	261,57±24,08	390,81±25,82
Площадь ядра гепатоцита (мкм ²)	67,13±7,01 *	84,0±8,29* **	76,01±8,56°	81,66±7,36°
Ядерно-цитоплазматический индекс	0,27±0,01*	0,33±0,02* **	0,29±0,01°	0,28±0,02°
Количество двуядерных гепатоцитов на 1 мм ²	380,97±10,15 *	473,14±23,55* **	343,43±25,8°	361,0±30,57°

Примечание:

$p < 0,05$ * с подгруппой сравнения зрелых животных;

$p < 0,05$ ** с контрольной подгруппой зрелых животных;

$p < 0,05$ ° с подгруппой сравнения старых животных;

$p < 0,05$ °° с контрольной подгруппой старых животных.

На 7 сутки после введения ММСК и ГСК зрелым и старым животным с частичной гепатэктомией в опытных группах отмечено повышение массы печени. При этом у зрелых животных масса печени достигла показателя подгруппы сравнения, тогда как у старых осталась ниже нормы. У зрелых животных масса

печени восстанавливается за счет активации деления клеток и снижения выраженности апоптоза. У старых животных происходит угнетение запрограммированной клеточной гибели, но не выявлено повышения митотического индекса.

В обеих возрастных группах обнаружено увеличение количества двуядерных клеток, повышение площади ядра гепатоцитов, что привело к возрастанию ЯЦИ. При оценке количества клеток с микроядрами выявлено снижение их количества в обеих возрастных группах на фоне котрансплантации ММСК и ГСК (таблица 47).

Таблица 47

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

Показатели	Значение			
	Зрелые		Старые	
	NaCl	ММСК+ГСК	NaCl	ММСК+ГСК
Масса печени, г	1,15±0,09*	1,53±0,12**	1,68±0,11°	1,97±0,16° °°
Апоптотический индекс, ‰	1,25±0,09*	0,92±0,09* **	1,81±0,17°	1,44±0,10° °°
Количество гепатоцитов с микроядрами, ‰	2,77±0,23*	2,10±0,17* **	4,60±0,37°	3,67±0,29°°
Митотический индекс, ‰	4,51±0,47*	5,74±0,49* **	1,50±0,10°	1,54±0,13°
Активность ферментов семейства PARP в клетках печени, MFI	59,3±5,2*	82,4±7,8* **	40,1±3,8°	49,7±4,6° °°
Число гепатоцитов, (на 1 мкм ²)	1427,71±116,98	1330,57±103,06	1009,57±74,49*	975,14±93,55*
Площадь гепатоцита (мкм ²)	286,41±22,44	289±23,63	348,19±28,36°	355,71±20,53°
Площадь цитоплазмы гепатоцита (мкм ²)	223,03±17,97	211,36±17,52	227,13±15,37	256,94±11,28
Площадь ядра гепатоцита (мкм ²)	63,39±5,12*	78,07±6,32* **	72,77±10,32°	98,77±9,25° °°
Ядерно-цитоплазматический индекс	0,29±0,02*	0,37±0,02* **	0,32±0,02°	0,38±0,03° °°
Количество двухъядерных гепатоцитов на 1 мм ²	320,77±10,64*	392,43±20,94* **	325,74±22,52°	391,73±31,97° °°

Примечание:

p<0,05 * с подгруппой сравнения зрелых животных;

p<0,05 ** с контрольной подгруппой зрелых животных;

p<0,05 ° с подгруппой сравнения старых животных;

p<0,05 °° с контрольной подгруппой старых животных.

Таким образом, полученные данные показали, что проведение котрансплантации ММСК и ГСК животным с частичной гепатэктомией приводит к повышению массы печени, причем у зрелых животных к 7 суткам масса печени достигла показателя подгруппы сравнения. При этом пролиферативная активность гепатоцитов увеличилась только у зрелых животных. В обеих возрастных группах произошло повышение активности ферментов, участвующих в репарации ДНК. Эти изменения нашли свое отражение в снижении выраженности апоптоза и уменьшении количества гепатоцитов с микроядрами.

4.2.2. Биохимические показатели крови животных разного возраста после частичной гепатэктомии на фоне котрансплантации ММСК и ГСК

Проведение сочетанной трансплантации ММСК и ГСК животным с частичной гепатэктомией не сопровождалось достоверными изменениями биохимических показателей крови на 1 сутки после операции (таблица 48).

Таблица 48

Биохимические показатели крови на 1 сутки после частичной гепатэктомии

Показатели		Значение			
		Зрелые		Старые	
		NaCl	ММСК+ГСК	NaCl	ММСК+ГСК
Показатели белкового обмена	общий белок (г/л)	51,29±4,81*	54,71±4,78*	52,79±3,64°	56,64±4,22°
	альбумин (г/л)	20,54±1,89*	22,21±1,93*	18,77±1,46°	19,40±2,57°
	мочевина (ммоль/л)	3,79±0,41*	3,99±0,27*	4,40±0,34°	4,49±0,36°
Показатели цитоллиза	аспартатаминотранс- фераза (Е/л)	416,79±29,76*	403,80±37,29*	462,80±31,91°	438,07±35,85°
	аланинаминотранс- фераза (Е/л)	296,91±22,64*	312,93±36,62*	368,14±30,68°	335,73±28,38°
Показатель холестаза	щелочная фосфатаза (Е/л)	136,10±4,66*	142,79±14,36*	163,96±30,48°	152,16±16,51°
Уровень глюкозы (ммоль/л)		4,01±0,53*	4,26±0,49*	3,84±0,32°	3,90±0,23°
Общий билирубин, (мкмоль/л)		19,84±2,85*	20,49±2,99*	17,79±1,56°	16,11±1,24°
Фибриноген (г/л)		2,93±0,22	3,14±0,24	3,47±0,21	3,40±0,20

Примечание:

$p < 0,05$ * с подгруппой сравнения зрелых животных;

$p < 0,05$ ° с подгруппой сравнения старых животных.

На 3 сутки после проведения частичной гепатэктомии у зрелых мышей получен эффект от введения ММСК и ГСК – произошло снижение показателей АСТ на 23,7%, АЛТ на 24,0%, ЩФ на 22,3%. У старых животных биохимические показатели крови в эти сроки достоверно не изменились (таблица 49).

Таблица 49

Биохимические показатели крови на 3 сутки после частичной гепатэктомии

Показатели		Значение			
		Зрелые		Старые	
		NaCl	ММСК+ГСК	NaCl	ММСК+ГСК
Показатели белкового обмена	общий белок (г/л)	50,03±4,82*	54,1±4,83*	47,76±4,48°	53,79±4,27°
	альбумин (г/л)	19,80±2,51*	21,71±1,79*	17,11±2,36°	18,30±2,14°
	мочевина (ммоль/л)	4,37±0,33*	4,54±0,69*	4,49±0,39°	4,79±0,39°
Показатели цитоллиза	аспартатаминотранс- фераза (Е/л)	209,53± 13,85*	159,83± 15,8* **	212,14± 19,08°	201,73± 18,35°
	аланинаминотранс- фераза (Е/л)	155,24± 9,38*	117,94± 10,95* **	211,50± 18,06°	197,60± 16,20°
Показатель холестаза	щелочная фосфатаза (Е/л)	106,67± 10,45*	82,90± 11,34* **	130,37± 25,94°	119,36± 10,22°
Уровень глюкозы (ммоль/л)		3,66±0,29*	3,71±0,36*	4,13±0,72°	4,56±0,31°
Общий билирубин, (мкмоль/л)		21,99±5,47*	19,84±1,85*	25,89±2,27°	23,20±2,20°
Фибриноген (г/л)		2,0±0,17*	2,31±0,29*	2,27±0,26°	2,44±0,22°

Примечание:

$p < 0,05$ * с подгруппой сравнения зрелых животных;

$p < 0,05$ ** с контрольной подгруппой зрелых животных;

$p < 0,05$ ° с подгруппой сравнения старых животных.

На 7 сутки после введения клеток животным с частичной гепатэктомией в обеих возрастных группах отмечено повышение общего белка, альбумина, мочевины. Также выявлено снижение уровня ферментов: АСТ, АЛТ, ЩФ. У зрелых животных активность ферментов цитоллиза и холестаза достигла значений подгруппы сравнения, тогда как у старых, осталась выше нормальных значений. У зрелых мышей с частичной гепатэктомией на фоне введения ММСК и ГСК также отмечено повышение уровня глюкозы (таблица 50).

Биохимические показатели крови на 7 сутки после частичной гепатэктомии

Показатели		Значение			
		Зрелые		Старые	
		NaCl	ММСК+ГСК	NaCl	ММСК+ГСК
Показатели белкового обмена	общий белок (г/л)	44,27±3,62*	50,0±4,97 *	47,63±3,77°	54,44±6,19*
	альбумин (г/л)	20,59±1,90*	23,64±3,22 *	17,13±1,42°	19,90±1,54*
	мочевина (ммоль/л)	4,57±0,46*	5,77±0,48**	4,54±0,35°	5,61±0,36°°
Показатели цитоллиза	аспартатаминотранс- фераза (Е/л)	153,86± 16,96*	111,94± 12,04**	183,59± 16,79°	144,34± 12,92° °°
	аланинаминотранс- фераза (Е/л)	137,10± 16,29*	96,24± 9,21**	175,01± 12,82°	132,17± 9,49° °°
Показатель холестаза	щелочная фосфатаза (Е/л)	83,11± 5,93*	65,59± 3,73 **	114,89± 9,67°	91,46± 6,82° °°
Уровень глюкозы (ммоль/л)		4,30±0,29*	5,20±0,34* **	4,26±0,39°	4,69±0,27°
Общ. Билирубин, (мкмоль/л)		15,41±2,76*	14,06±1,28*	18,14±2,21°	16,34±1,84°
Фибриноген (г/л)		2,20±0,31*	2,83±0,26**	2,44±0,16°	2,99±0,16° °°

Примечание:

$p < 0,05$ * с подгруппой сравнения зрелых животных;

$p < 0,05$ ** с контрольной подгруппой зрелых животных;

$p < 0,05$ ° с подгруппой сравнения старых животных;

$p < 0,05$ °° с контрольной подгруппой старых животных.

Проведенные исследования показали, что сочетанная трансплантация ММСК и ГСК зрелым и старым животным с частичной гепатэктомии приводит к снижению активности цитолитических ферментов (АСТ, АЛТ), ферментов холестаза (ЩФ), восстановлению уровня мочевины. У зрелых животных трансплантация клеток также способствует повышению уровня глюкозы.

С целью выяснения механизмов активации митотической активности гепатоцитов после котрансплантации ММСК и ГСК проведены исследования по определению HGF в сыворотке крови. Получено увеличение фактора роста гепатоцитов у зрелых животных, которым была проведена трансплантация клеток. У старых животных содержание HGF после введения клеток достоверно не изменилось (рисунок 40). Такие же данные были получены и при введении только ММСК. Это связано с тем, что ГСК не синтезируют фактор роста гепатоцитов, поэтому их введение не сопровождалось изменением этого показателя.

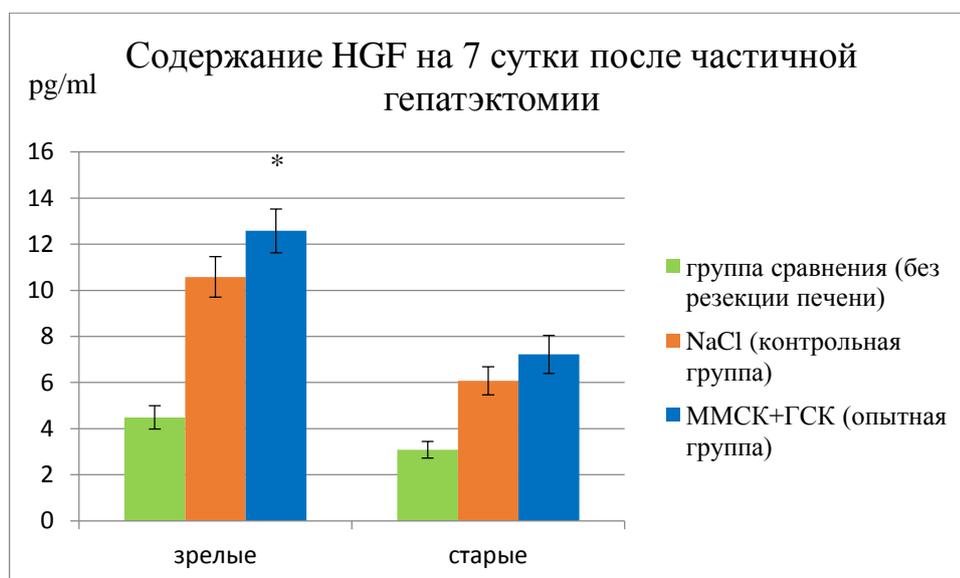


Рис. 40. Содержание HGF (пкг/мл) на 7 сутки после частичной гепатэктомии

4.3. Изучение влияния котрансплантации MMCK и ГСК на морфофункциональное состояние печени животных разного возраста при токсическом повреждении печени

4.3.1. Морфологическое исследование печени после котрансплантации MMCK и ГСК животным разного возраста после токсического повреждения печени

На первые сутки после сочетанного введения MMCK и ГСК на фоне токсического повреждения при анализе выраженности индекса воспалительной активности в печени не выявлено достоверных отличий между опытной и контрольной подгруппами (таблица 51).

Таблица 51

Выраженность воспалительных явлений в печени на 1 сутки после введения CCl_4

Показатели	Зрелые		Старые	
	NaCl	MMCK+ГСК	NaCl	MMCK+ГСК
Некрозы, баллы	6,0±0,52	5,1±0,49	7,2±0,63	6,4±0,58
Дистрофия гепатоцитов, баллы	3,1±0,24	2,8±0,20	3,9±0,28	3,2±0,31
Воспалительный инфильтрат, баллы	3,3±0,30	2,9±0,25	3,9±0,31	3,5±0,33
Итого ИВА:	12,4±1,13	10,8±0,93	15,0±1,20	13,1±1,16

На 1 сутки после сочетанной трансплантации ММСК и ГСК на фоне введения четыреххлористого углерода зрелым лабораторным животным обнаружено повышение митотического индекса на 24,2 %, увеличение количества двухъядерных гепатоцитов на 22,5 %, по сравнению с данными контрольной подгруппы. У старых лабораторных животных обнаружено лишь повышение количества двуядерных гепатоцитов (таблица 52).

Таблица 52

Морфометрическая характеристика репаративных процессов в печени мышей на 1 сутки после введения CCl_4

Показатели	Значение			
	Зрелые		Старые	
	NaCl	ММСК+ГСК	NaCl	ММСК+ГСК
Апоптотический индекс, ‰	4,87±0,36*	4,34±0,36*	5,64±0,45*	5,04±0,48°
Количество гепатоцитов с микроядрами, ‰	2,26±0,21	2,14±0,19	3,27±0,26	3,10±0,29
Митотический индекс, ‰	17,74±2,13*	22,04±1,53* **	7,59±0,50*	7,36±0,69°
Количество гепатоцитов На 1 мкм ²	2060,71±121,10*	2151,86±171,55*	1475,29±127,18	1533,43±105,92
Площадь гепатоцита (мкм ²)	186,43±9,38*	193,00±12,94*	212,99±19,27*	225,06±14,42°
Площадь цитоплазмы гепатоцита (мкм ²)	132,83±8,85*	138,30±11,80*	151,34±15,72*	160,46±9,39°
Площадь ядра гепатоцита (мкм ²)	53,60±3,60	57,23±4,98	61,64±4,26	64,60±5,03
Ядерно-цитоплазматический индекс	0,41±0,04*	0,41±0,02*	0,41±0,03*	0,40±0,01°
Количество двухъядерных гепатоцитов на 1 мм ²	830,43±52,65*	1017,57±60,78* **	1035,86±92,41*	1285,71±194,82° °°

Примечание:

$p < 0,05$ * с подгруппой сравнения зрелых животных;

$p < 0,05$ ** с контрольной подгруппой зрелых животных;

$p < 0,05$ ° с подгруппой сравнения старых животных;

$p < 0,05$ °° с контрольной подгруппой старых животных.

При анализе выраженности воспалительной реакции в печени на 3 сутки после введения четыреххлористого углерода получено, что у зрелых животных после котрансплантации ММСК и ГСК произошло снижение индекса воспалительной активности за счет уменьшения инфильтрации и дистрофии гепатоцитов. У старых животных достоверных изменений в эти сроки не выявлено (таблица 53).

Таблица 53

Выраженность воспалительных явлений в печени на 3 сутки после введения CCl_4

Показатели	Зрелые		Старые	
	NaCl	ММСК+ГСК	NaCl	ММСК+ГСК
Некрозы, баллы	5,6±0,50	4,7±0,42	6,8±0,57	5,8±0,46
Дистрофия гепатоцитов, баллы	2,9±0,22	2,4±0,20*	3,5±0,30	2,9±0,32
Воспалительный инфильтрат, баллы	3,1±0,21	2,5±0,18*	3,7±0,30	3,2±0,28
Итого ИВА:	11,6±1,08	9,6±0,88*	14,0±1,23	11,9±0,95

Примечание:

$p < 0,05$ * с контрольной подгруппой зрелых животных;

$p < 0,05$ ° с контрольной подгруппой старых животных.

При изучении морфометрических показателей печени на 3 сутки после введения четыреххлористого углерода у зрелых и старых животных, которым вводили ММСК и ГСК, отмечено снижение уровня запрограммированной клеточной гибели. При этом активация митотической активности произошла только у зрелых животных. В обеих возрастных группах выявлено повышение количества двуядерных гепатоцитов, увеличение площади ядра гепатоцитов, повышение ядерно-цитоплазматического индекса. В обеих возрастных группах при анализе количества гепатоцитов с микроядрами отмечено снижение их количества (таблица 54).

Морфометрическая характеристика репаративных процессов в печени мышей
на 3 сутки после введения CCl_4

Показатели	Значение			
	Зрелые		Старые	
	NaCl	ММСК+ГСК	NaCl	ММСК+ГСК
Апоптотический индекс, ‰	3,70±0,31*	2,67±0,23* **	4,34±0,39°	3,20±0,31° °°
Количество гепатоцитов с микроядрами, ‰	5,39±0,41*	4,09±0,38* **	8,43±0,62°	6,16±0,45° °°
Митотический индекс, ‰	15,20±1,20*	20,40±1,60* **	6,80±0,51°	7,01±0,50°
Количество гепатоцитов На 1 мкм ²	1902,86±82,69*	1842,71±132,90*	1431,29±116,33	1500,14±110,08
Площадь гепатоцита (мкм ²)	203,60±8,46*	210,64±11,31*	228,04±17,47°	232,89±14,27°
Площадь цитоплазмы гепатоцита (мкм ²)	150,33±10,60*	146,47±9,53*	157,50±15,14°	141,97±10,87°
Площадь ядра гепатоцита (мкм ²)	53,27±2,32	64,17±4,48* **	70,54±5,34°	90,91±5,44° °°
Ядерно-цитоплазматический индекс	0,36±0,04*	0,44±0,03* **	0,45±0,03°	0,64±0,05° °°
Количество двухъядерных гепатоцитов на 1 мм ²	474,43±46,08*	621,14±58,98* **	736,14±56,37°	946,57±75,47° °°

Примечание:

$p < 0,05$ * с подгруппой сравнения зрелых животных;

$p < 0,05$ ** с контрольной подгруппой зрелых животных;

$p < 0,05$ ° с подгруппой сравнения старых животных;

$p < 0,05$ °° с контрольной подгруппой старых животных.

В печени на 7 сутки после введения четыреххлористого углерода сочетанное введение ММСК и ГСК привело к снижению выраженности воспалительной реакции. У зрелых животных это произошло за счет сокращения зон некрозов, уменьшения дистрофии гепатоцитов, снижения воспалительной инфильтрации. У старых животных уменьшение индекса воспалительной активности произошло за счет снижения воспалительной инфильтрации и дистрофии гепатоцитов. При этом сокращение зон некроза у старых животных не обнаружено (таблица 55).

Выраженность воспалительных явлений в печени на 7 сутки после введения CCl_4

Показатели	Зрелые		Старые	
	NaCl	ММСК+ГСК	NaCl	ММСК+ГСК
Некрозы, баллы	3,8±0,32	3,1±0,28*	4,6±0,41	4,2±0,38
Дистрофия гепатоцитов, баллы	2,0±0,17	1,5±0,12*	2,6±0,22	2,0±0,22*
Воспалительный инфильтрат, баллы	2,2±0,23	1,7±0,14*	2,8±0,22	2,2±0,20*
Итого ИВА:	8,0±0,81	6,4±0,57*	10,0±0,82	8,4±0,70*

Примечание:

$p < 0,05$ * с контрольной подгруппой зрелых животных;

$p < 0,05$ ° с контрольной подгруппой старых животных.

При анализе морфометрических показателей зрелых и старых мышей на 7 сутки после введения четыреххлористого углерода в опытной группе отмечено повышение митотического индекса, угнетение запрограммированной клеточной гибели. Увеличение площади ядер гепатоцитов привело к увеличению ядерно-цитоплазматического индекса. Также на 7 сутки выявлено повышение количества двуядерных гепатоцитов по сравнению с контрольными подгруппами. При анализе количества гепатоцитов с микроядрами отмечено снижение их количества в обеих возрастных группах по сравнению с контрольными подгруппами. В эти сроки также выявлено повышение активности ферментов, участвующих в репарации ДНК, и у зрелых, и у старых мышей (таблица 56).

Морфофункциональная характеристика репаративных процессов в печени мышей
на 7 сутки после введения CCl_4

Показатели	Значение			
	Зрелые		Старые	
	NaCl	ММСК+ГСК	NaCl	ММСК+ГСК
Апоптотический индекс, ‰	3,74±0,31*	2,67±0,20* **	4,60±0,31°	3,27±0,32° °°
Количество гепатоцитов с микроядрами, ‰	5,46±0,43*	3,89±0,30* **	8,57±0,74°	6,09±0,50° °°
Митотический индекс, ‰	17,06±1,64*	23,56±1,85* **	7,37±0,40°	9,06±0,67° °°
Активность ферментов семейства PARP в клетках печени, MFI	91,3±8,8*	140,2±13,4* **	52,2±4,7°	72,8±6,7° °°
Количество гепатоцитов На 1 мкм ²	1970,71±139,96*	1752,0±130,0	1408,86±117,88	1515,29±113,67
Площадь гепатоцита (мкм ²)	388,57±15,22*	486,0±24,29* **	471,43±30,49°	638,43±60,37° °°
Площадь цитоплазмы гепатоцита (мкм ²)	143,77±12,86*	147,61±7,62*	148,93±14,02°	155,7±14,09°
Площадь ядра гепатоцита (мкм ²)	60,94±4,68*	79,86±4,53* **	76,80±6,74°	96,31±8,47° °°
Ядерно-цитоплазматический индекс	0,43±0,06*	0,54±0,02* **	0,52±0,02°	0,62±0,02° °°
Количество двухъядерных гепатоцитов на 1 мм ²	204,71±10,84*	227,47±12,08	225,73±19,00°	267,71±16,10

Примечание:

$p < 0,05$ * с подгруппой сравнения зрелых животных;

$p < 0,05$ ** с контрольной подгруппой зрелых животных;

$p < 0,05$ ° с подгруппой сравнения старых животных;

$p < 0,05$ °° с контрольной подгруппой старых животных.

4.3.2. Биохимические показатели крови животных разного возраста после котрансплантации ММСК и ГСК на фоне токсического повреждения печени

При изучении биохимических показателей крови на 1 сутки после сочетанной трансплантации ММСК и ГСК на фоне введения четыреххлористого углерода обнаружено снижение уровня АСТ на 20,4%, АЛТ на 24,3%, ЩФ на 22,2%. У старых лабораторных животных изменений биохимических показателей крови в эти сроки не произошло (таблица 57).

Таблица 57

Биохимические показатели крови на 1 сутки после введения CCl_4

Показатели		Значение			
		Зрелые		Старые	
		NaCl	ММСК+ГСК	NaCl	ММСК+ГСК
Показатели белкового обмена	общий белок (г/л)	60,15±5,68	66,79±4,53	64,54±5,72	67,93±6,73
	альбумин (г/л)	25,71±2,19	26,73±2,86	22,24±2,43	23,01±2,61
	мочевина (ммоль/л)	5,11±0,34	5,26±0,54	5,79±0,47	5,73±0,78
Показатели цитоллиза	аспартатаминотранс- фераза (Е/л)	215,37± 11,66*	171,39± 13,16* **	235,99± 21,06°	216,45± 16,35°
	аланинаминотранс- фераза (Е/л)	210,13± 12,34*	159,08± 12,98* **	249,95± 16,59°	221,35± 18,26°
Показатель холестаза	щелочная фосфатаза (Е/л)	122,89± 9,21*	95,64± 7,51* **	152,08± 11,73°	141,26± 10,65°
Уровень глюкозы (ммоль/л)		4,28±0,40*	4,53±0,40*	3,81±0,33°	4,01±0,39°
Общий билирубин, (мкмоль/л)		15,14±1,09*	14,56±0,71*	17,24±1,54°	16,01±1,29°
Фибриноген (г/л)		2,87±0,20	2,93±0,23	3,50±0,26	3,70±0,34

Примечание:

$p < 0,05$ * с подгруппой сравнения зрелых животных;

$p < 0,05$ ** с контрольной подгруппой зрелых животных;

$p < 0,05$ ° с подгруппой сравнения старых животных.

У мышей с токсическим повреждением печени на 3 сутки после сочетанной трансплантации ММСК и ГСК отмечено снижение содержания ферментов, характеризующих цитоллиз гепатоцитов: АСТ, АЛТ, ЩФ. У зрелых лабораторных животных также выявлено повышение уровня глюкозы по сравнению с данными контрольной подгруппы. У старых животных не произошло восстановление уровня глюкозы (таблица 58).

Биохимические показатели крови на 3 сутки после введения CCl_4

Показатели		Значение			
		Зрелые		Старые	
		NaCl	ММСК+ГСК	NaCl	ММСК+ГСК
Показатели белкового обмена	общий белок (г/л)	48,96±3,39*	52,78±5,05*	50,14±4,04°	54,19±4,38°
	альбумин (г/л)	20,51±1,59*	23,43±2,21*	15,86±1,71°	17,10±1,70°
	мочевина (ммоль/л)	5,33±0,48	5,66±0,45	6,08±0,53	5,83±0,50
Показатели цитоллиза	аспартатаминотранс- фераза (Е/л)	170,55± 11,13*	132,91± 12,21* **	180,85± 11,76°	133,70± 10,58° °°
	аланинаминотранс- фераза (Е/л)	166,46± 10,36 *	124,99± 11,16* **	210,95± 12,18°	165,46± 13,23° °°
Показатель холестаза	щелочная фосфатаза (Е/л)	106,73± 9,58 *	84,88± 7,13* **	125,46± 10,07°	96,88± 7,73° °°
Уровень глюкозы (ммоль/л)		4,25±0,36 *	5,30±0,43**	4,28±0,34°	4,60±0,35°
Общий билирубин, (мкмоль/л)		11,85±0,90 *	11,31±0,83*	14,61±1,09°	13,59±1,54°
Фибриноген (г/л)		2,34±0,18 *	2,59±0,24*	2,49±0,19°	2,73±0,23°

Примечание:

$p < 0,05$ * с подгруппой сравнения зрелых животных;

$p < 0,05$ ** с контрольной подгруппой зрелых животных;

$p < 0,05$ ° с подгруппой сравнения старых животных;

$p < 0,05$ °° с контрольной подгруппой старых животных.

Сочетанная трансплантация ММСК и ГСК на 7 сутки после введения четыреххлористого углерода привела к снижению уровня АСТ до значений подгруппы сравнения, снижение уровня АЛТ, понижение ЩФ. Также на фоне сочетанного введения ММСК и ГСК обнаружено повышение уровня фибриногена в обеих возрастных подгруппах. У зрелых лабораторных животных также выявлено увеличение содержания общего белка, альбуминов. У старых животных сочетанное введение ММСК и ГСК не привело к изменению белоксинтетической функции печени (таблица 59).

Биохимические показатели крови на 7 сутки после введения CCl_4

Показатели		Значение			
		Зрелые		Старые	
		NaCl	ММСК+ГСК	NaCl	ММСК+ГСК
Показатели белкового обмена	общий белок (г/л)	51,18±4,58*	64,80±5,0**	54,05±4,80°	57,08±5,15°
	альбумин (г/л)	22,74±1,86*	28,04±2,20**	17,06±1,71°	19,15±2,34°
	мочевина (ммоль/л)	6,41±0,49	6,05±0,58	6,53±0,60	6,19±0,59
Показатели цитоллиза	аспартатаминотранс- фераза (Е/л)	138,45± 9,29*	102,26± 9,51**	143,78± 10,28°	103,89± 10,29°°
	аланинаминотранс- фераза (Е/л)	154,50± 9,85*	116,30± 10,95* **	177,60± 12,98°	133,11± 11,34° °°
Показатель холестаза	щелочная фосфатаза (Е/л)	91,20±7,98*	68,06±6,21**	103,04±9,10°	80,78±7,73°°
Уровень глюкозы (ммоль/л)		5,90±0,50	6,31±0,56	4,51±0,44°	5,15±0,30
Общий билирубин, (мкмоль/л)		11,89±0,67*	11,39±0,76*	14,06±1,34°	13,38±1,08°
Фибриноген (г/л)		2,37±0,20*	2,93±0,19**	2,50±0,17°	3,10±0,20°°

Примечание:

$p < 0,05$ * с подгруппой сравнения зрелых животных;

$p < 0,05$ ** с контрольной подгруппой зрелых животных;

$p < 0,05$ ° с подгруппой сравнения старых животных;

$p < 0,05$ °° с контрольной подгруппой старых мышей.

Получено, что сочетанная трансплантация ММСК и ГСК при токсическом повреждении печени приводит к снижению активности ферментов цитоллиза и холестаза, нормализации уровня фибриногена в обеих возрастных группах. У зрелых лабораторных животных на фоне проведения сочетанной трансплантации ММСК и ГСК также происходит восстановление белковосинтетической функции печени.

Заключение к главе 4

В результате проведенных исследований показано, что котрансплантация ММСК и ГСК животным разного возраста не влияет на процесс физиологической регенерации печени.

В результате исследования получено, что сочетанная трансплантация плацентарных ММСК и ГСК способна положительно влиять на морфофункциональное состояние печени после частичной гепатэктомии. Но при этом, полученные эффекты сопоставимы с эффектами от введения только ММСК.

Изменения со стороны структуры печени в ответ на сочетанную трансплантацию клеток у зрелых животных выражаются в активации митотического деления клеток, угнетении апоптоза. При этом возрастные особенности выявились в том, что у старых животных митотический индекс не меняется при введении клеток (рисунок 41).

Полученные эффекты связаны со способностью ММСК к синтезу HGF, повышение уровня которого у зрелых животных выявлено в ходе исследования.

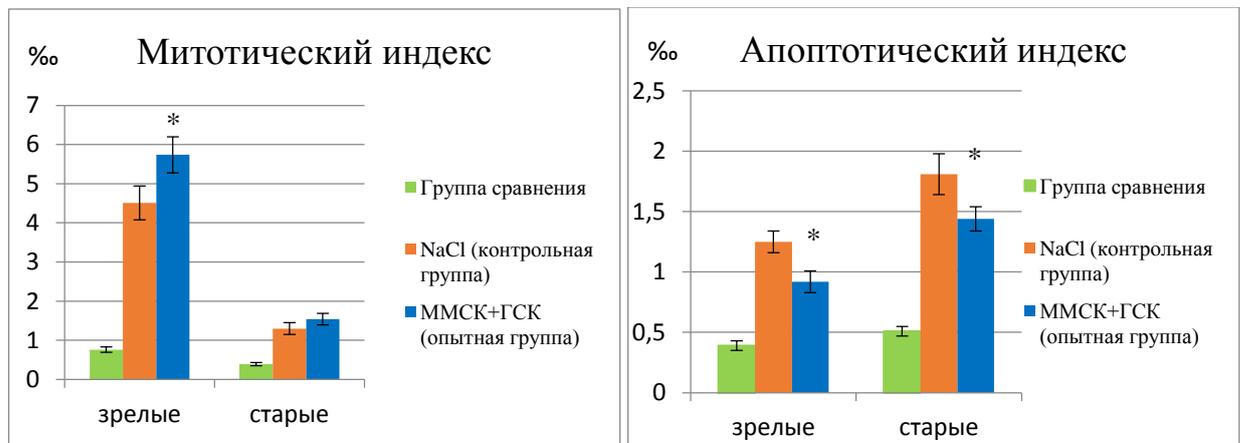


Рис. 41. Показатели регенерации печени на 7 сутки после резекции печени.

Зрелые и старые животные ответили на проведение сочетанной трансплантации ММСК и ГСК повышением количества двухъядерных гепатоцитов, уменьшением количества гепатоцитов с микроядрами.

Со стороны биохимических показателей крови введение данных видов клеток в условиях резекции печени обеспечивает снижение показателей ферментов, характеризующих цитолиз клеток и холестаза. У зрелых лабораторных животных введение ММСК и ГСК после частичной гепатэктомии также приводит к повышению уровня глюкозы. Подобные изменения у зрелых и старых животных были выявлены и при введении ММСК.

В условиях токсического повреждения печени выявлены более выраженные изменения морфофункционального состояния печени при проведении

котрансплантации ММСК и ГСК по сравнению с введением только ММСК. Так уже на первые сутки после сочетанного введения клеток на фоне токсического повреждения печени у зрелых лабораторных животных выявлена активация митотической активности. В обеих возрастных группах на 1 сутки повышается количество двуядерных гепатоцитов.

Отмечено, что сочетанная трансплантация ММСК и ГСК привела к уменьшению активности воспалительной реакции в печени у зрелых и старых животных. У зрелых животных произошло уменьшение зон некроза, дистрофии гепатоцитов, снижение выраженности инфильтрации.

При введении только ММСК не выявлено уменьшения воспалительной инфильтрации. Противовоспалительный эффект появился при добавлении ГСК, которые под влиянием провоспалительных цитокинов способны к синтезу TGF- β [110].

Известно, что TGF- β оказывает противовоспалительное действие за счет уменьшения выработки клетками иммунной системы ИЛ-1, ФНО, за счет торможения пролиферации Т- и В-лимфоцитов, подавления активности макрофагов [101]. У старых животных ограничения зон некроза не выявлено.

Структурные изменения печени нашли свое отражение и в изменениях биохимических показателей крови.

Уже на 1 сутки после котрансплантации ММСК и ГСК на фоне токсического повреждения печени отмечается снижение активности ферментов цитолиза и холестаза у зрелых животных (рисунок 42).

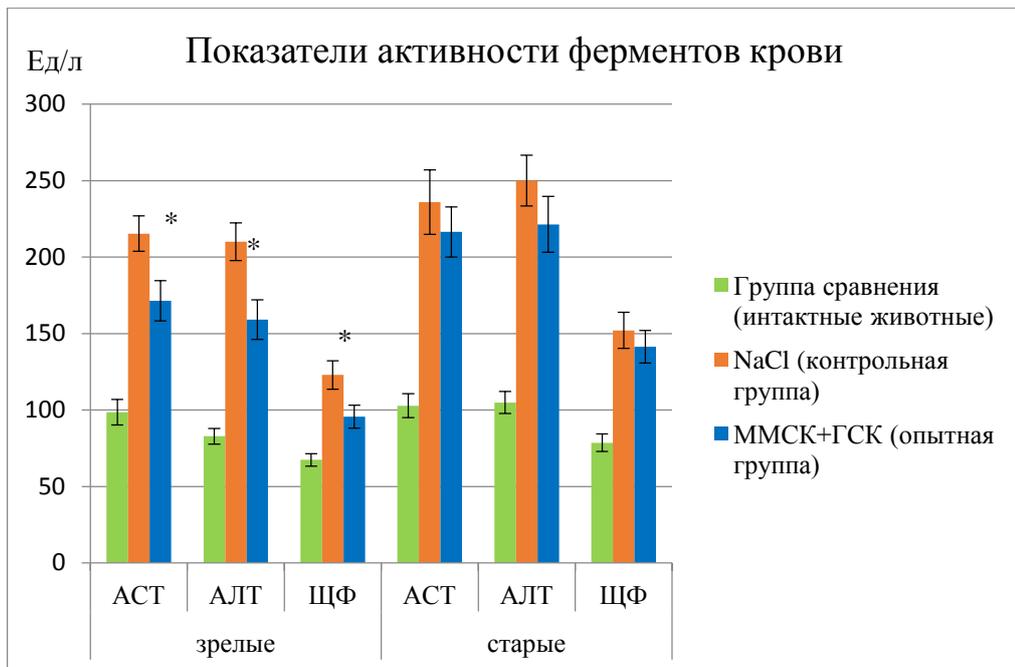


Рис. 42. Показатели активности ферментов сыворотки крови зрелых и старых животных на 1 сутки после введения CCl_4

Также сочетанная трансплантация ММСК и ГСК в условиях острого токсического повреждения печени привела к восстановлению показателей белкового обмена у зрелых животных. У старых лабораторных животных белковосинтетическая функция печени не изменилась (рисунок 43).

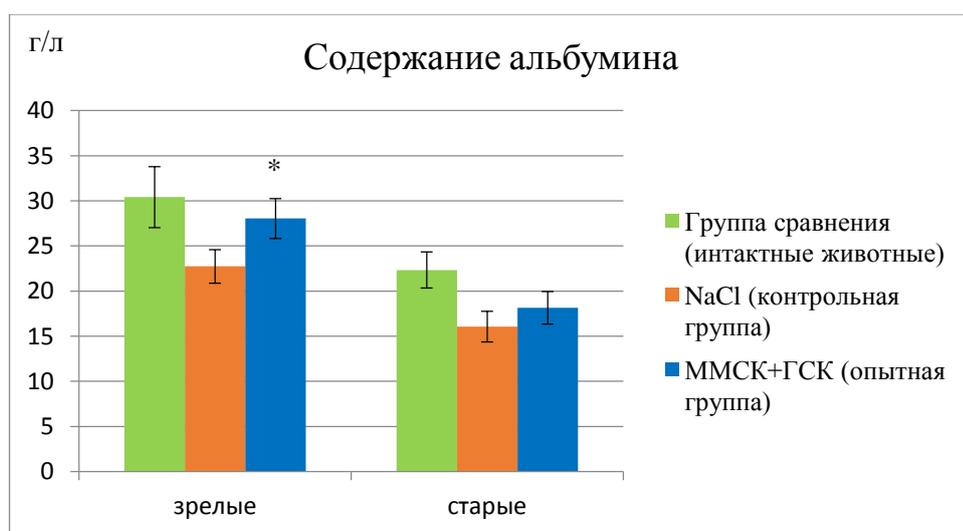


Рис. 43. Показатели белковосинтетической функции печени на 7 сутки после введения CCl_4

Проведенные исследования показали, что после частичной гепатэктомии эффекты от котрансплантации ММСК и ГСК сопоставимы с эффектами при введении только ММСК. В то же время, в условиях токсического повреждения печени отмечается более выраженное восстановление морфофункционального состояния печени при проведении котрансплантации ММСК с ГСК, по сравнению с введением только ММСК. Это открывает новые перспективы для использования сочетанной трансплантации ММСК и ГСК для активации регенерации печени в условиях ее токсического повреждения.

**ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ КОТРАНСПЛАНТАЦИИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ И ПЕРИСИНУСОИДАЛЬНЫХ
КЛЕТОК ПЕЧЕНИ НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ
ПЕЧЕНИ ЖИВОТНЫХ РАЗНОГО ВОЗРАСТА В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ
УСЛОВИЯХ И ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ ПЕЧЕНИ**

**5.1. Влияние котрансплантации мультипотентных мезенхимальных
стромальных и перисинусоидальных клеток печени на
морфофункциональное состояние печени животных разного возраста
в физиологических условиях**

Проведение сочетанной трансплантации ММСК и ПКП животным без повреждения печени на 1, 3, 7 сутки после введения клеток не сопровождается изменением морфометрических показателей печени (таблица 60, 61, 62).

Влияние котрансплантации ММСК и ПКП на морфометрические показатели
печени на 1 сутки после введения клеток

Показатели	Значение			
	Зрелые		Старые	
	NaCl (подгруппа сравнения)	ММСК+ПКП (контрольная подгруппа)	NaCl (подгруппа сравнения)	ММСК+ПКП (контрольная подгруппа)
Масса печени, г	1,80±0,13	1,81±0,15	2,21±0,17	2,25±0,18
Апоптотический индекс, ‰	0,41±0,05	0,42±0,06	0,51±0,04	0,53±0,05
Количество гепатоцитов с микроядрами, ‰	2,20±0,17	2,16±0,16	3,20±0,20	3,24±0,21
Митотический индекс, ‰	0,48±0,07	0,47±0,03	0,40±0,05	0,40±0,03
Количество гепатоцитов На 1 мкм ²	1567,57±102,90	1512,29±103,47	1323,14±82,73	1334,29±108,16
Площадь гепатоцита (мкм ²)	264,90±6,60	261,03±20,57	297,10±20,77	295,54±24,18
Площадь цитоплазмы гепатоцита (мкм ²)	214,33±10,33	208,93±22,82	239,5±24,74	237,09±22,53
Площадь ядра гепатоцита (мкм ²)	50,57±3,80	52,10±3,60	57,60±3,97	58,46±4,79
Ядерно-цитоплазматический индекс	0,24±0,03	0,26±0,04	0,25±0,04	0,25±0,03
Количество двухъядерных гепатоцитов на 1 мм ²	233,43±12,2	242,57±14,49	261,06±8,61	269,17±11,8

Влияние котрансплантации ММСК и ПКП на морфометрические показатели
печени на 3 сутки после введения клеток

Показатели	Значение			
	Зрелые		Старые	
	NaCl (подгруппа сравнения)	ММСК+ПКП (контрольная подгруппа)	NaCl (подгруппа сравнения)	ММСК+ПКП (контрольная подгруппа)
Масса печени, г	1,81±0,15	1,77±0,14	2,22±0,14	2,18±0,14
Апoptотический индекс, ‰	0,43±0,04	0,42±0,05	0,49±0,04	0,50±0,05
Количество гепатоцитов с микроядрами, ‰	2,17±0,17	2,24±0,18	3,21±0,22	3,16±0,21
Митотический индекс, ‰	0,47±0,06	0,48±0,03	0,39±0,04	0,40±0,03
Количество гепатоцитов На 1 мкм ²	1525,57±101,06	1510,14±99,27	1301,14±96,41	1275,86±121,84
Площадь гепатоцита (мкм ²)	267,54±6,38	261,83±19,37	310,77±13,46	318,33±32,34
Площадь цитоплазмы гепатоцита (мкм ²)	219,14±7,12	213,97±16,49	252,16±15,02	256,73±27,84
Площадь ядра гепатоцита (мкм ²)	48,40±3,57	47,86±4,53	58,61±3,61	61,60±6,00
Ядерно-цитоплазматический индекс	0,22±0,02	0,22±0,01	0,23±0,03	0,24±0,02
Количество двухъядерных гепатоцитов на 1 мм ²	239,86±17,02	244,19±20,73	259,66±7,63	264,41±21,78

Влияние котрансплантации ММСК и ПКП на морфофункциональное состояние печени на 7 сутки после введения клеток

Показатели	Значение			
	Зрелые		Старые	
	NaCl (подгруппа сравнения)	ММСК+ПКП (контрольная подгруппа)	NaCl (подгруппа сравнения)	ММСК+ПКП (контрольная подгруппа)
Масса печени, г	1,76±0,13	1,81±0,13	2,18±0,11	2,24±0,18
Апоптотический индекс, ‰	0,39±0,03	0,40±0,05	0,51±0,04	0,51±0,06
Количество гепатоцитов с микроядрами, ‰	2,10±0,17	2,19±0,13	3,19±0,21	3,26±0,25
Митотический индекс, ‰	0,50±0,06	0,48±0,03	0,38±0,05	0,38±0,03
Активность ферментов семейства PARP в клетках печени, MFI	45,2±4,1	46,0±4,4	30,4±2,8	28,2±2,5
Количество гепатоцитов На 1 мкм ²	1538,14±103,59	1468,14±89,27	1296,29±91,27	1337,14±88,94
Площадь гепатоцита (мкм ²)	264,67±5,86	261,83±19,37	293,69±12,08	301,00±18,89
Площадь цитоплазмы гепатоцита (мкм ²)	214,21±8,10	213,97±16,49	234,27±14,61	232,04±19,21
Площадь ядра гепатоцита (мкм ²)	50,46±3,29	47,86±4,53	59,41±2,73	62,07±4,57
Ядерно-цитоплазматический индекс	0,24±0,02	0,22±0,01	0,26±0,03	0,27±0,03
Количество двухъядерных гепатоцитов на 1 мм ²	237,29±8,24	244,19±20,73	265,71±11,02	251,23±20,21

Таким образом, сочетанная трансплантация ММСК и ПКП не приводит к изменению морфофункционального состояния печени зрелых и старых животных.

При анализе биохимических показателей крови животных на 1, 3, 7 сутки после введения ММСК и ПКП также не выявлено эффекта от введения клеток (таблица 63, таблица 64, таблица 65).

Биохимические показатели крови на 1 сутки после трансплантации ММСК и ПКП

Показатели		Значение			
		Зрелые		Старые	
		NaCl (подгруппа сравнения)	ММСК+ПКП (контрольная подгруппа)	NaCl (подгруппа сравнения)	ММСК+ПКП (контрольная подгруппа)
Показатели белкового обмена	общий белок (г/л)	69,37±3,20	66,46±4,75	73,39±4,42	74,70±5,37
	альбумин (г/л)	30,03±2,83	28,23±2,88	23,76±2,21	24,46±2,54
	мочевина (ммоль/л)	5,76±1,28	6,0±0,46	6,20±0,43	6,40±0,43
Показатели цитолита	аспартатаминотранс- фераза (Е/л)	98,53±8,42	101,69±6,69	102,73±7,83	105,76±9,67
	аланинаминотранс- фераза (Е/л)	82,80±5,11	85,00±5,14	104,87±7,19	96,86±8,32
Показатель холестаза	щелочная фосфатаза (Е/л)	67,37±4,03	65,03±4,30	78,61±5,82	76,28±5,15
Глюкоза (ммоль/л)		6,10±0,57	6,31±0,47	5,93±0,36	6,11±0,56
Общий билирубин (мкмоль/л)		9,76±1,15	9,56±0,97	12,07±0,46	11,33±1,12
Фибриноген (г/л)		3,80±0,23	3,64±0,26	3,80±0,23	3,91±0,30

Биохимические показатели крови на 3 сутки после трансплантации ММСК и ПКП

Показатели		Значение			
		Зрелые		Старые	
		NaCl (подгруппа сравнения)	ММСК+ПКП (контрольная подгруппа)	NaCl (подгруппа сравнения)	ММСК+ПКП (контрольная подгруппа)
Показатели белкового обмена	общ. белок (г/л)	68,31±3,93	70,63±5,58	73,07±4,56	76,43±4,80
	альбумин (г/л)	30,84±4,25	33,87±3,68	24,29±1,93	25,04±2,91
	мочевина (ммоль/л)	6,21±0,87	5,99±0,38	6,46±0,67	6,36±0,40
Показатели цитолита	аспартатаминотранс- фераза (Е/л)	97,26±8,47	104,16±9,78	102,39±9,52	108,23±7,05
	аланинаминотранс- фераза (Е/л)	81,13±8,66	82,67±8,11	98,59±7,38	94,64±8,72
Показатель холестаза	щелочная фосфатаза (Е/л)	66,34±5,24	64,34±5,61	78,74±6,04	80,94±6,09
Глюкоза (ммоль/л)		5,73±0,69	5,63±0,51	5,89±0,41	6,09±0,44
Общий билирубин (мкмоль/л)		8,90±1,14	8,67±0,72	14,04±0,41	15,96±1,01
Фибриноген (г/л)		3,93±0,29	3,69±0,36	3,93±0,29	3,84±0,31

Биохимические показатели крови на 7 сутки после трансплантации ММСК и ПКП

Показатели		Значение			
		Зрелые		Старые	
		NaCl (подгруппа сравнения)	ММСК+ПКП (контрольная подгруппа)	NaCl (подгруппа сравнения)	ММСК+ПКП (контрольная подгруппа)
Показатели белкового обмена	общий белок (г/л)	66,46±4,36	68,49±5,31	72,24±4,32	69,97±5,03
	альбумин (г/л)	31,41±3,38	29,97±3,0	22,34±1,99	26,69±2,02
	мочевина (ммоль/л)	6,11±0,61	5,96±0,47	6,27±0,65	6,46±0,49
Показатели цитоллиза	аспартатаминотранс- фераза (Е/л)	104,56±9,07	98,40±7,74	101,19±8,41	105,40±9,69
	аланинаминотранс- фераза (Е/л)	89,23±4,43	85,64±6,68	109,57±7,36	96,49±7,13
Показатель холестаза	щелочная фосфатаза (Е/л)	63,30±4,00	65,61±6,19	75,56±5,11	74,57±5,49
Глюкоза (ммоль/л)		6,44±0,62	6,14±0,45	5,79±0,44	5,87±0,45
Общий билирубин (мкмоль/л)		9,37±0,65	9,66±0,81	13,13±0,62	13,41±0,82
Фибриноген (г/л)		3,80±0,26	3,60±0,37	3,80±0,26	3,86±0,22

Таким образом, проведенные исследования показали, что проведение сочетанной трансплантации двух видов клеток: ММСК и ПКП зрелым и старым лабораторным животным не приводит к изменению биохимических показателей крови.

5.2. Изучение влияния котрансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных и перисинусоидальных клеток печени на морфофункциональное состояние печени животных разного возраста после частичной гепатэктомии

5.2.1. Морфометрические показатели печени животных разного возраста после частичной гепатэктомии на фоне сочетанного введения ММСК и ПКП

На 1 сутки после резекции печени у зрелых и старых мышей на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ПКП выявлено угнетение запрограммированной клеточной гибели по сравнению с данными контрольных подгрупп (таблица 66). Подобного эффекта не было выявлено при проведении котрансплантации ММСК и ГСК, а также при введении только ММСК.

Морфометрическая характеристика репаративных процессов в печени мышей
на 1 сутки после частичной гепатэктомии

Показатели	Значение			
	Зрелые		Старые	
	NaCl (контрольная подгруппа)	ММСК+ПКП (опытная подгруппа)	NaCl (контрольная подгруппа)	ММСК+ПКП (опытная подгруппа)
Масса печени, г	0,64±0,05*	0,70±0,07*	0,82±0,07°	0,88±0,08°
Апoptотический индекс, ‰	0,90±0,06*	0,67±0,07* **	1,08±0,15°	0,86±0,06° °°
Количество гепатоцитов с микроядрами, ‰	2,23±0,21	2,27±2,21	3,23±0,23	3,19±0,24
Митотический индекс, ‰	0,52±0,03	0,52±0,03	0,42±0,03	0,41±0,03
Количество гепатоцитов На 1 мкм ²	1192,0±89,43*	1151,29±108,24*	1021,0±91,71°	949,14±86,12°
Площадь гепатоцита (мкм ²)	340,20±24,43*	346,43±26,78	360,70±30,80°	363,99±23,24°
Площадь цитоплазмы гепатоцита (мкм ²)	258,56±17,02*	261,17±28,97	225,07±20,25	251,34±28,32
Площадь ядра гепатоцита (мкм ²)	81,64±7,45*	85,26±6,22	77,59±6,53°	75,54±6,02°
Ядерно-цитоплазматический индекс	0,32±0,01*	0,33±0,06	0,35±0,01°	0,31±0,06°
Количество двухъядерных гепатоцитов на 1 мм ²	334,31±12,30*	345,14±11,59	320,74±28,49°	330,56±22,72°

Примечание:

$p < 0,05$ * с подгруппой сравнения зрелых животных;

$p < 0,05$ ** с контрольной подгруппой зрелых животных;

$p < 0,05$ ° с подгруппой сравнения старых животных.

При изучении морфометрических показателей печени зрелых животных на 3 сутки после частичной гепатэктомии у животных, которым вводили ММСК и ПКП обнаружено увеличение массы печени по сравнению с контрольной подгруппой. Восстановлению массы способствовало повышение митотической активности гепатоцитов зрелых животных. У старых животных в эти сроки не произошло увеличения митотического индекса и, в результате, не обнаружено повышения массы печени. В обеих возрастных группах, так же как и на первые

сутки отмечается снижение запрограммированной клеточной гибели. Также у зрелых и старых животных сочетанная трансплантация ММСК и ПКП способствовала повышению количества двуядерных гепатоцитов, увеличению площади ядра гепатоцитов, что привело к повышению ЯЦИ (таблица 67). Интересно, что проведение трансплантации только ММСК на 3 сутки после частичной гепатэктомии не сопровождалось изменениями морфометрических показателей печени.

Таблица 67

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

Показатели	Значение			
	Зрелые		Старые	
	NaCl (контрольная подгруппа)	ММСК+ПКП (опытная подгруппа)	NaCl (контрольная подгруппа)	ММСК+ПКП (опытная подгруппа)
Масса печени, г	1,04±0,09*	1,24±0,10* **	1,25±0,09°	1,43±0,11°
Апоптотический индекс, ‰	2,13±0,20*	1,54±0,15* **	2,29±0,20°	1,78±0,15° °°
Количество гепатоцитов с микроядрами, ‰	3,37±0,26*	2,97±0,20*	5,11±0,44°	4,63±0,33°
Митотический индекс, ‰	8,1±0,60*	10,03±0,75* **	2,81±0,27°	3,15±0,25°
Количество гепатоцитов На 1 мкм ²	1206,72±91,96*	1160,0±113,14*	996,42±76,65°	1009,71±95,96°
Площадь гепатоцита (мкм ²)	331,81±24,02 *	333,43±18,20*	379,31±32,58°	373,11±26,87°
Площадь цитоплазмы гепатоцита (мкм ²)	243,64±19,25	249,14±9,84	261,57±24,08	276,19±17,53
Площадь ядра гепатоцита (мкм ²)	67,13±7,01*	84,29±8,61* **	76,01±8,56°	96,93±9,34° °°
Ядерно-цитоплазматический индекс	0,27±0,01*	0,34±0,02* **	0,29±0,01°	0,35±0,01° °°
Количество двухъядерных гепатоцитов на 1 мм ²	380,97±10,15 *	484,0±35,71* **	343,43±25,8°	411,00±32,0° °°

Примечание:

$p < 0,05$ * с подгруппой сравнения зрелых животных;

$p < 0,05$ ** с контрольной подгруппой зрелых животных;

$p < 0,05$ ° с подгруппой сравнения старых животных.

При анализе морфометрических показателей зрелых и старых лабораторных мышей на 7 сутки после резекции печени на фоне введения ММСК и ПКП в опытных подгруппах сохраняются эффекты, обнаруженные на 3 сутки: снижение

запрограммированной клеточной гибели гепатоцитов, увеличение количества двуядерных гепатоцитов, повышение размеров ядра, возрастание ЯЦИ. У зрелых животных также выявлено повышение митотической активности, что привело к восстановлению массы печени. У старых лабораторных животных, в отличие от зрелых, на фоне введения стволовых клеток не произошло повышения митотической активности. При оценке количества гепатоцитов с микроядрами обнаружено их снижение после проведения сочетанной трансплантации ММСК и ПКП в обеих возрастных группах. Получено, что котрансплантация данных видов клеток способствовала повышению активности ферментов репарации ДНК. Этот эффект был выявлен и при введении только ММСК (таблица 68).

Таблица 68

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

Показатели	Значение			
	Зрелые		Старые	
	NaCl (контрольная подгруппа)	ММСК+ПКП (опытная подгруппа)	NaCl (контрольная подгруппа)	ММСК+ПКП (опытная подгруппа)
Масса печени, г	1,15±0,09*	1,48±0,09**	1,68±0,11°	2,0±0,18° °°
Апоптотический индекс, ‰	1,25±0,09 *	0,89±0,08* **	1,81±0,17°	1,39±0,13° °°
Количество гепатоцитов с микроядрами, ‰	2,77±0,23*	2,14±0,18**	4,60±0,37°	3,61±0,24° °°
Митотический индекс, ‰	4,51±0,47 *	5,80±0,37* **	1,50±0,10°	1,66±0,14°
Активность ферментов семейства PARP в клетках печени, MFI	59,3±5,21*	86,3±8,06* **	40,1±3,82°	53,4±5,04° °°
Количество гепатоцитов на 1 мкм ²	1427,71±116,98	1354,0±138,0	1009,57±74,49°	954,14±87,02°
Площадь гепатоцита (мкм ²)	286,41±22,44	292,57±20,94	348,19±28,36°	351,80±21,06°
Площадь цитоплазмы гепатоцита (мкм ²)	223,03±17,97	212,21±13,88	227,13±15,37	254,21±13,16
Площадь ядра гепатоцита (мкм ²)	63,39±5,12 *	80,36±7,08* **	72,77±10,32°	97,59±8,04° °°
Ядерно-цитоплазматический индекс	0,29±0,02 *	0,38±0,02* **	0,32±0,02°	0,38±0,01° °°
Количество двухъядерных гепатоцитов на 1 мм ²	320,77±10,64 *	404,71±27,47* **	325,74±22,52°	401,76±24,09° °°

Примечание: p<0,05 * с подгруппой сравнения зрелых животных;
p<0,05 ** с контрольной подгруппой зрелых животных;
p<0,05 ° с подгруппой сравнения старых животных;
p<0,05 °° с контрольной подгруппой старых животных.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что сочетанная трансплантация ММСК и ПКП у зрелых лабораторных животных с частичной гепатэктомией способствует более раннему восстановлению морфофункционального состояния печени по сравнению с введением только ММСК. Повышение массы печени у зрелых животных отмечается уже на 3 сутки после проведения котрансплантации, в то время как при введении только ММСК восстановление массы органа отмечалось лишь на 7 сутки.

5.2.2. Биохимические показатели крови животных разного возраста после сочетанной трансплантации ММСК и ПКП на фоне частичной гепатэктомии

При изучении биохимических показателей крови на 1 сутки после резекции печени на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ПКП отмечено снижение уровня АСТ на 24,7%, АЛТ на 25,5%, щелочной фосфатазы на 23,3%. У старых лабораторных животных на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ПКП существенных отличий от данных контрольной подгруппы не выявлено (таблица 69). Такие эффекты не были выявлены при введении только ММСК.

Таблица 69

Биохимические показатели крови мышей на 1 сутки после частичной гепатэктомии

Показатели		Значение			
		Зрелые		Старые	
		NaCl (контрольная подгруппа)	ММСК+ПКП (опытная подгруппа)	NaCl (контрольная подгруппа)	ММСК+ПКП (опытная подгруппа)
Показатели белкового обмена	общий белок (г/л)	51,29±4,81*	53,71±4,73*	52,79±3,64°	55,07±4,49°
	альбумин (г/л)	20,54±1,89*	22,74±2,24*	18,77±1,46°	19,31±2,19°
	мочевина (ммоль/л)	3,79±0,41*	4,11±0,36*	4,40±0,34°	4,59±0,41°
Показатели цитоллиза	аспартатаминотранс- фераза (Е/л)	416,79± 29,76*	313,84± 21,44* **	462,80± 31,91°	447,11± 32,90°
	аланинаминотранс- фераза (Е/л)	296,91± 22,64*	221,26± 20,11* **	368,14± 30,68°	340,74± 25,52°
Показатель холестаза	щелочная фосфатаза (Е/л)	136,10± 4,66*	104,43± 9,78* **	163,96± 30,48°	146,91± 12,87
Глюкоза (ммоль/л)		4,01±0,53*	4,37±0,40*	3,84±0,32°	3,81±0,28°
Общий билирубин (мкмоль/л)		19,84±2,85*	18,76±1,87*	17,79±1,56°	16,89±1,36°
Фибриноген (г/л)		3,47±0,21	3,66±0,24	3,47±0,21	3,40±0,20°

Примечание: $p < 0,05$ * с подгруппой сравнения зрелых животных;

$p < 0,05$ ** с контрольной подгруппой зрелых животных;

$p < 0,05$ ° с подгруппой сравнения старых животных;

$p < 0,05$ °° с контрольной подгруппой старых животных.

На 3 сутки после резекции печени на фоне введения ММСК и ПКП также наблюдается снижение активности ферментов, характеризующих цитолиз и холестаза. Снижение активности ферментов обнаружено не только у зрелых, но и у старых животных, что отличает эффекты котрансплантации ММСК и ПКП от эффектов при введении только ММСК. Также отличием эффектов при введении ММСК и ПКП от трансплантации ММСК является повышение уровня мочевины. Этот эффект выявлен только у зрелых животных (таблица 70).

Таблица 70

Биохимические показатели крови мышей на 3 сутки после частичной
гепатэктомии

Показатели		Значение			
		Зрелые		Старые	
		NaCl (контрольная подгруппа)	ММСК+ПКП (опытная подгруппа)	NaCl (контрольная подгруппа)	ММСК+ПКП (опытная подгруппа)
Показатели белкового обмена	общий белок (г/л)	50,03±4,82*	53,67±4,34*	47,76±4,48°	52,66±4,58°
	альбумин (г/л)	19,80±2,51*	22,01±2,04*	17,11±2,36°	18,76±1,75°
	мочевина (ммоль/л)	4,37±0,33*	5,26±0,29* **	4,49±0,39°	4,87±0,35°
Показатели цитолиза	аспартатаминотранс- фераза (Е/л)	209,53± 13,85*	156,97± 13,35* **	212,14± 19,08°	165,63± 13,46° °°
	аланинаминотранс- фераза (Е/л)	155,24± 9,38*	114,16± 13,53* **	211,50± 18,06°	161,53± 14,09° °°
Показатель холестаза	щелочная фосфатаза (Е/л)	106,67± 10,45*	83,47± 8,40* **	130,37± 25,94°	103,70± 8,51° °°
Глюкоза (ммоль/л)		3,66±0,29*	3,87±0,32*	4,13±0,72°	4,60±0,31°
Общий билирубин (мкмоль/л)		21,99±5,47*	20,13±1,61*	25,89±2,27°	23,49±2,41°
Фибриноген (г/л)		2,27±0,26*	2,67±0,22*	2,27±0,26°	2,44±0,22°

Примечание:

$p < 0,05$ * с подгруппой сравнения зрелых животных;

$p < 0,05$ ** с контрольной подгруппой зрелых животных;

$p < 0,05$ ° с подгруппой сравнения старых животных;

$p < 0,05$ °° с контрольной подгруппой старых животных.

Анализируя биохимические показатели крови зрелых и старых лабораторных животных на 7 сутки после резекции печени на фоне введения ММСК и ПКП, отмечено повышение содержания общего белка, альбумина. При этом у зрелых животных уровень общего белка и альбумина достиг значений подгруппы сравнения, тогда как у старых оставался выше значений нормы. Также в обеих возрастных группах отмечено повышение мочевины, снижение уровня

ферментов цитолиза (АСТ, АЛТ) и холестаза (ЩФ). При этом, у зрелых животных уровень ферментов достиг показателей подгруппы сравнения, тогда как у старых – остался выше нормальных значений. В обеих возрастных группах также выявлено повышение уровня фибриногена на фоне введения ММСК и ПКП. У зрелых лабораторных животных, в отличие от старых, отмечено повышение уровня глюкозы (таблица 71).

Таблица 71

Биохимические показатели крови мышей на 7 сутки после частичной
гепатэктомии

Показатели		Значение			
		Зрелые		Старые	
		NaCl (контрольная подгруппа)	ММСК+ПКП (опытная подгруппа)	NaCl (контрольная подгруппа)	ММСК+ПКП (опытная подгруппа)
Показатели белкового обмена	общий белок (г/л)	44,27±3,62*	60,27±5,09**	47,63±3,77°	57,56±3,55° °°
	альбумин (г/л)	20,59±1,90*	28,06±2,16**	17,13±1,42°	23,00±2,23° °°
	мочевина (ммоль/л)	4,57±0,46*	5,63±0,35**	4,54±0,35°	5,60±0,40°°
Показатели цитолиза	аспартатаминотранс- фераза (Е/л)	153,86± 16,96*	111,21± 10,01**	183,59± 16,79°	140,39± 12,04° °°
	аланинаминотранс- фераза (Е/л)	137,10± 16,29*	95,50± 8,57 **	175,01± 12,82°	129,04± 8,73° °°
Показатель холестаза	щелочная фосфатаза (Е/л)	83,11±5,93*	65,61±4,36**	114,89±9,67°	90,33±7,47° °°
Глюкоза (ммоль/л)		4,30±0,29*	5,20±0,34* **	4,26±0,39°	4,56±0,33°
Общий билирубин (мкмоль/л)		15,41±2,76*	13,70±0,83*	18,14±2,21°	16,90±1,63°
Фибриноген (г/л)		2,20±0,23*	2,87±0,24**	2,44±0,16°	2,99±0,17° °°

Примечание:

$p < 0,05$ * с подгруппой сравнения зрелых животных;

$p < 0,05$ ** с контрольной подгруппой зрелых животных;

$p < 0,05$ ° с подгруппой сравнения старых животных;

$p < 0,05$ °° с контрольной подгруппой старых животных.

Проведенные исследования показали, что сочетанная трансплантация ММСК и ПКП зрелым и старым лабораторным животным после частичной гепатэктомии приводит к восстановлению белковосинтетической функции печени, нормализации уровня мочевины, снижению активности ферментов, характеризующих цитолиз гепатоцитов и холестаза. У зрелых лабораторных животных также выявлен эффект от сочетанной трансплантации ММСК и ПКП на

углеводный обмен. Введение ММСК зрелым и старым животным способствовало лишь снижению активности ферментов, повышению уровня фибриногена. Преимущества котрансплантации ММСК и ПКП по сравнению с введением только ММСК выявлено и при анализе содержания фактора роста гепатоцитов. На 7 сутки после частичной гепатэктомии при анализе уровня фактора роста гепатоцитов получено увеличение его в опытных подгруппах зрелых и старых животных. При трансплантации ММСК, а также проведении котрансплантации ММСК и ГСК повышение содержания HGF отмечалось лишь у зрелых животных (таблица 72).

Таблица 72

Содержание HGF на 7 сутки после частичной гепатэктомии

Группы животных	Зрелые	Старые
животные без резекции - группа сравнения	4,49±0,39	3,08±0,36
NaCl (контрольная группа)	10,58±0,88*	6,07±0,63°
ММСК	13,0±1,02* **	7,02±0,70°
ММСК+ГСК	12,58±0,95* **	7,22±0,82°
ММСК+ПКП	16,7±2,62* **	9,2±1,73° °°

Примечание:

$p < 0,05$ * с подгруппой сравнения зрелых животных;

$p < 0,05$ ** с контрольной подгруппой зрелых животных;

$p < 0,05$ ° с подгруппой сравнения старых животных;

$p < 0,05$ °° с контрольной подгруппой старых животных.

Таким образом, сочетанная трансплантация ММСК и ПКП сопровождается более выраженным восстановлением морфофункционального состояния печени в условиях частичной гепатэктомии по сравнению с введением ММСК или ММСК и ГСК. Это делает котрансплантацию ММСК и ПКП более предпочтительной в условиях частичной гепатэктомии.

5.3. Изучение влияния котрансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных и перисинусоидальных клеток печени на морфофункциональное состояние печени животных разного возраста при токсическом повреждении печени

5.3.1. Морфометрические показатели печени животных разного возраста после котрансплантации ММСК и ПКП при токсическом повреждении печени

При анализе выраженности воспалительной реакции в печени на 1 сутки после проведения котрансплантации ММСК и ПКП на фоне токсического повреждения печени не выявлено достоверных различий между опытными и контрольными подгруппами (таблица 73).

Таблица 73

Выраженность воспалительных явлений в печени мышей на 1 сутки после введения CCl_4

Показатели	Зрелые		Старые	
	NaCl (контрольная подгруппа)	ММСК+ПКП (опытная подгруппа)	NaCl (контрольная подгруппа)	ММСК+ПКП (опытная подгруппа)
Некрозы, баллы	6,0±0,52	5,8±0,56	7,2±0,63	7,1±0,69
Дистрофия гепатоцитов, баллы	3,1±0,24	3,0±0,29	3,9±0,28	3,8±0,30
Воспалительный инфильтрат, баллы	3,3±0,30	3,2±0,31	3,9±0,31	3,9±0,35
Итого ИВА:	12,4±1,13	12,0±1,88	15,0±1,20	14,8±1,40

Также и при сравнении морфометрических показателей зрелых и старых животных на 1 сутки после введения четыреххлористого углерода зрелым и старым животным не обнаружено достоверных отличий между опытной и контрольной подгруппами (таблица 74).

Морфометрическая характеристика репаративных процессов в печени мышей
на 1 сутки после введения CCl_4

Показатели	Значение			
	Зрелые		Старые	
	NaCl (контрольная подгруппа)	ММСК+ПКП (опытная подгруппа)	NaCl (контрольная подгруппа)	ММСК+ПКП (опытная подгруппа)
Апоптотический индекс, ‰	4,87±0,36*	4,76±0,38*	5,64±0,45°	5,49±0,53°
Количество гепатоцитов с микроядрами, ‰	2,26±0,21	2,34±0,22	3,27±0,26	3,21±0,24
Митотический индекс, ‰	17,74±1,85*	18,33±1,25*	7,59±0,50°	7,09±0,73°
Количество гепатоцитов На 1 мкм ²	2060,71±121,10*	2117,14±168,98*	1475,29±127,18	1509,86±124,98
Площадь гепатоцита (мкм ²)	186,43±12,23*	194,01±17,44*	212,99±19,27°	205,09±18,53°
Площадь цитоплазмы гепатоцита (мкм ²)	132,83±11,71*	137,51±12,62*	151,34±15,72°	144,79±12,90°
Площадь ядра гепатоцита (мкм ²)	53,60±3,60	56,50±4,86	61,64±4,26	60,30±5,69
Ядерно-цитоплазматический индекс	0,41±0,04*	0,41±0,03*	0,41±0,03°	0,42±0,01°
Количество двухъядерных гепатоцитов на 1 мм ²	830,43±52,65*	818,29±68,33*	1035,86±92,41°	1097,57±97,22°

Примечание:

$p < 0,05$ * с подгруппой сравнения зрелых животных;

$p < 0,05$ ° с подгруппой сравнения старых животных;

На 3 сутки после проведения котрансплантации ММСК и ПКП при анализе воспалительной активности в печени в опытной и контрольной подгруппах, также как и на 1 сутки, достоверных отличий не обнаружено (таблица 75).

Выраженность воспалительных явлений в печени на 3 сутки после введения CCl_4

Показатели	Зрелые		Старые	
	NaCl (контрольная подгруппа)	ММСК+ПКП (опытная подгруппа)	NaCl (контрольная подгруппа)	ММСК+ПКП (опытная подгруппа)
Некрозы, баллы	5,6±0,50	5,4±0,50	6,8±0,57	6,7±0,64
Дистрофия гепатоцитов, баллы	2,9±0,22	2,5±0,18	3,5±0,30	3,3±0,30
Воспалительный инфильтрат, баллы	3,1±0,21	2,9±0,26	3,7±0,30	3,5±0,33
Итого ИВА:	11,6±1,08	10,8±0,94	14,0±1,23	13,5±13,0

При изучении морфометрических показателей печени зрелых и старых лабораторных животных на 3 сутки после введения четыреххлористого углерода у животных, которым вводили ММСК и ПКП, отмечено снижение уровня апоптоза, уменьшение количества гепатоцитов с микроядрами, увеличение количества двуядерных гепатоцитов. Также отмечено увеличение площади ядра гепатоцитов, и, как следствие этого, повышение ядерно-цитоплазматического индекса. У зрелых животных в эти сроки на фоне сочетанного введения ММСК и ПКП отмечается повышение митотической активности. У старых животных введение клеток при токсическом повреждении печени не привело к активации клеточной регенерации (таблица 76). Схожие изменения наблюдались и при введении только ММСК.

Морфометрическая характеристика репаративных процессов в печени мышей на 3
сутки после введения CCl_4

Показатели	Значение			
	Зрелые		Старые	
	NaCl (контрольная подгруппа)	ММСК+ПКП (опытная подгруппа)	NaCl (контрольная подгруппа)	ММСК+ПКП (опытная подгруппа)
Апоптотический индекс, ‰	3,70±0,31*	2,57±0,24* **	4,34±0,39°	3,41±0,24° °°
Количество гепатоцитов с микроядрами, ‰	5,39±0,41*	3,81±0,27* **	8,43±0,62°	6,04±0,59° °°
Митотический индекс, ‰	15,20±1,20*	20,47±1,65* **	6,80±0,51°	7,53±0,71°
Количество гепатоцитов На 1 мкм ²	1902,86±125,55*	2102,71±146,53*	1431,29±116,33	1552,43±125,06
Площадь гепатоцита (мкм ²)	205,03±19,60*	196,01±19,90*	228,04±17,47°	242,26±19,45°
Площадь цитоплазмы гепатоцита (мкм ²)	151,76±17,96*	129,11±15,90*	157,50±15,14°	154,74±12,92°
Площадь ядра гепатоцита (мкм ²)	53,27±2,32	66,90±4,64* **	70,54±5,34°	87,51±7,87° °°
Ядерно-цитоплазматический индекс	0,35±0,03*	0,52±0,04* **	0,45±0,03°	0,57±0,03° °°
Количество двухъядерных гепатоцитов на 1 мм ²	474,43±46,08*	636,00±62,00* **	736,14±56,37°	913,86±85,84° °°

Примечание:

$p < 0,05$ * с подгруппой сравнения зрелых животных;

$p < 0,05$ ** с контрольной подгруппой зрелых животных;

$p < 0,05$ ° с подгруппой сравнения старых животных;

$p < 0,05$ °° с контрольной подгруппой старых животных.

К 7 суткам после котрансплантации ММСК и ПКП, как и при введении ММСК, отмечается снижение выраженности воспалительной реакции в печени у зрелых животных. Произошло это за счет уменьшения некрозов, дистрофии гепатоцитов, снижения воспалительной инфильтрации (таблица 77).

Выраженность воспалительных явлений в печени на 7 сутки после введения CCl_4

Показатели	Зрелые		Старые	
	NaCl (контрольная подгруппа)	ММСК+ПКП (опытная подгруппа)	NaCl (контрольная подгруппа)	ММСК+ПКП (опытная подгруппа)
Некрозы, баллы	3,8±0,32	3,0±0,27*	4,6±0,41	4,2±0,38
Дистрофия гепатоцитов, баллы	2,0±0,17	1,6±0,14*	2,6±0,22	2,1±0,18°
Воспалительный инfiltrат, баллы	2,2±0,23	1,8±0,15*	2,8±0,22	2,3±0,20°
Итого ИВА:	8,0±0,81	6,4±0,60*	10,0±0,82	8,6±0,80

Примечание:

$p < 0,05$ * с контрольной подгруппой зрелых животных;

$p < 0,05$ ° с контрольной подгруппой старых животных.

При анализе морфометрических показателей зрелых и старых лабораторных мышей на 7 сутки после введения четыреххлористого углерода в опытной группе отмечено повышение митотического индекса, снижение выраженности апоптоза. Также в обеих возрастных группах после сочетанного введения ММСК и ПКП обнаружено увеличение площади ядер гепатоцитов, что способствовало увеличению ядерно-цитоплазматического индекса. Кроме того, выявлено повышение количества двухъядерных гепатоцитов по сравнению с контрольными подгруппами. Анализируя количество цитогенетически измененных клеток, отмечено их снижение и у зрелых, и у старых животных по сравнению с данными контрольных подгрупп (таблица 78). Подобные эффекты были выявлены и при трансплантации ММСК.

Морфо-функциональная характеристика репаративных процессов в печени
мышей на 7 сутки после введения CCl_4

Показатели	Значение			
	Зрелые		Старые	
	NaCl (контрольная подгруппа)	ММСК+ПКП (опытная подгруппа)	NaCl (контрольная подгруппа)	ММСК+ПКП (опытная подгруппа)
Апоптотический индекс, ‰	3,74±0,31*	2,70±0,31* **	4,60±0,31°	3,47±0,40° °°
Количество гепатоцитов с микроядрами, ‰	5,46±0,43*	4,01±0,30* **	8,57±0,74°	5,97±0,48° °°
Митотический индекс, ‰	17,06±1,64*	21,43±1,75* **	7,37±0,40°	9,10±0,60° °°
Активность ферментов семейства PАРР в клетках печени, MFI	91,3±8.8*	133,5±12.2* **	52,2±4.7°	69,2±6.1° °°
Количество гепатоцитов На 1 мкм ²	1970,71±139,96*	1796,14±125,27	1408,86±117,88	1333,86±92,12
Площадь гепатоцита (мкм ²)	204,71±16,27*	235,60±18,14*	225,73±19,00°	279,31±22,44°°
Площадь цитоплазмы гепатоцита (мкм ²)	143,77±14,80*	158,73±12,49*	148,93±14,02°	170,50±11,40°
Площадь ядра гепатоцита (мкм ²)	60,94±4,68*	83,51±7,21* **	76,80±6,74°	108,81±13,31° °°
Ядерно-цитоплазматический индекс	0,43±0,04*	0,53±0,03* **	0,52±0,02°	0,64±0,05° °°
Количество двухъядерных гепатоцитов на 1 мм ²	388,57±30,94*	505,29±58,33* **	471,43±30,49°	618,86±58,78° °°

Примечание:

$p < 0,05$ * с подгруппой сравнения зрелых животных;

$p < 0,05$ ** с контрольной подгруппой зрелых животных;

$p < 0,05$ ° с подгруппой сравнения старых животных;

$p < 0,05$ °° с контрольной подгруппой старых животных.

Таким образом, получено, что сочетанная трансплантация ММСК и ПКП зрелым и старым лабораторным животным в условиях токсического повреждения печени приводит к тем же изменениям морфофункционального состояния печени, что и введение только ММСК. Это может быть связано с тем, что введение тетрахлорметана сопровождается выраженной воспалительной реакцией в печени,

что приводит к активации ПКП, они приобретают миофибробластоподобный фенотип и не оказывают стимулирующего влияния на морфофункциональное состояние печени.

5.3.2. Биохимические показатели крови животных разного возраста после котрансплантации ММСК и ПКП при токсическом повреждении печени

При изучении биохимических показателей крови зрелых и старых лабораторных животных на 1 сутки после введения четыреххлористого углерода на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ПКП существенных отличий от данных контрольных подгрупп не выявлено (таблица 79).

Таблица 79

Биохимические показатели крови мышей на 1 сутки после введения CCl_4

Показатели		Значение			
		Зрелые		Старые	
		NaCl (контрольная подгруппа)	ММСК+ПКП (опытная подгруппа)	NaCl (контрольная подгруппа)	ММСК+ПКП (опытная подгруппа)
Показатели белкового обмена	общий белок (г/л)	60,15±5,68	65,05±5,45	64,54±5,72	62,31±5,81
	альбумин (г/л)	25,71±2,19	24,67±2,28	22,24±2,43	21,93±1,68
	мочевина (ммоль/л)	5,11±0,34	5,33±0,55	5,79±0,47	5,29±0,41
Показатели цитоллиза	аспартатаминотранс- фераза (Е/л)	215,37±11,66 *	205,53±19,48*	235,99±21,06°	241,64±20,88°
	аланинаминотранс- фераза (Е/л)	210,13±12,34 *	201,43±14,44*	249,95±16,59°	253,21±20,38°
Показатель холестаза	щелочная фосфатаза (Е/л)	122,89±9,21 *	116,34±11,51*	152,08±11,73°	148,04±14,74°
Глюкоза (ммоль/л)		4,28±0,40 *	4,36±0,41 *	3,81±0,33°	4,11±0,32°
Общий билирубин (мкмоль/л)		15,14±1,09 *	14,31±0,98*	17,24±1,54°	16,5±1,39°
Фибриноген (г/л)		2,87±0,20	3,04±0,24	3,50±0,26	3,74±0,26

Примечание:

$p < 0,05$ * с подгруппой сравнения зрелых животных;

$p < 0,05$ ° с подгруппой сравнения старых животных.

При анализе биохимических показателей крови лабораторных животных на 3 сутки после введения четыреххлористого углерода на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ПКП отмечено снижение содержания ферментов, характеризующих цитоллиз гепатоцитов: АСТ, АЛТ (таблица 80).

Биохимические показатели крови мышей на 3 сутки после введения CCl_4

Показатели		Значение			
		Зрелые		Старые	
		NaCl (контрольная подгруппа)	ММСК+ПКП (опытная подгруппа)	NaCl (контрольная подгруппа)	ММСК+ПКП (опытная подгруппа)
Показатели белкового обмена	общий белок (г/л)	48,96±3,39*	51,43±4,80*	50,14±4,04°	52,99±4,16°
	альбумин (г/л)	20,51±1,59*	22,39±2,22*	15,86±1,71°	16,24±1,64°
	мочевина (ммоль/л)	5,33±0,48	5,49±0,49	6,08±0,53	5,79±0,49
Показатели цитоллиза	аспартатаминотранс- фераза (Е/л)	170,55± 11,13*	126,08± 11,00* **	180,85± 11,76°	141,91± 12,74° °°
	аланинаминотранс- фераза (Е/л)	166,46± 10,36*	126,91± 10,59* **	210,95± 12,18°	160,55± 13,54° °°
Показатель холестаза	щелочная фосфатаза (Е/л)	106,73±9,58*	93,28±9,20*	125,46±10,07°	115,23±9,11°
Глюкоза (ммоль/л)		4,25±0,36*	4,46±0,39*	4,28±0,34°	4,55±0,31°
Общий билирубин (мкмоль/л)		11,85±0,90*	10,93±0,95*	14,61±1,09°	12,69±1,21°
Фибриноген (г/л)		2,34±0,18*	2,44±0,21*	2,49±0,19°	2,63±0,21°

Примечание:

$p < 0,05$ * с подгруппой сравнения зрелых животных;

$p < 0,05$ ** с контрольной подгруппой зрелых животных;

$p < 0,05$ ° с подгруппой сравнения старых животных;

$p < 0,05$ °° с контрольной подгруппой старых животных.

На 7 сутки после проведения сочетанной трансплантации ММСК и ПКП на фоне введения четыреххлористого углерода у зрелых и старых животных отмечено снижение уровня АСТ до значений подгруппы сравнения, снижение уровня АЛТ, повышение показателя фибриногена. У зрелых животных также выявлено повышение содержания общего белка, альбумина после котрансплантации ММСК и ПКП. У старых животных эти изменения не обнаружены (таблица 81).

Биохимические показатели крови мышей на 7 сутки после введения CCl_4

Показатели		Значение			
		Зрелые		Старые	
		NaCl (контрольная подгруппа)	ММСК+ПКП (опытная подгруппа)	NaCl (контрольная подгруппа)	ММСК+ПКП (опытная подгруппа)
Показатели белкового обмена	общий белок (г/л)	51,18±4,58*	63,3±5,77**	54,05±4,80°	57,68±4,11°
	альбумин (г/л)	22,74±1,86*	28,75±2,51**	17,06±1,71°	19,01±1,79°
	мочевина (ммоль/л)	6,41±0,49	6,21±0,51	6,53±0,60	6,16±0,56
Показатели цитоллиза	аспартатаминотранс- фераза (Е/л)	138,45±9,29 *	99,46±5,58**	143,78±10,28°	111,50±9,48°°
	аланинаминотранс- фераза (Е/л)	154,50± 9,85 *	115,03± 10,50* **	177,60± 12,98°	123,68± 11,83° °°
Показатель холестаза	щелочная фосфатаза (Е/л)	91,20±7,98*	69,65±6,39**	103,04±9,10°	93,56±7,91°
Глюкоза (ммоль/л)		5,90±0,50	6,25±0,59	4,51±0,44°	4,61±0,32°
Общий билирубин (мкмоль/л)		11,89±0,67*	11,71±0,79*	14,06±1,34°	12,64±1,02°
Фибриноген (г/л)		2,37±0,20*	3,00±0,23**	2,50±0,17°	3,00±0,20°°

Примечание:

$p < 0,05$ * с подгруппой сравнения зрелых животных;

$p < 0,05$ ** с контрольной подгруппой зрелых животных;

$p < 0,05$ ° с подгруппой сравнения старых животных;

$p < 0,05$ °° с контрольной подгруппой старых животных.

Полученные данные свидетельствуют о том, что проведение сочетанной трансплантации ММСК и ПКП зрелым и старым лабораторным животным при токсическом повреждении печени сопровождается теми же эффектами, что были выявлены и при введении только ММСК: снижение активности цитолитических ферментов, повышению уровня фибриногена. У зрелых животных также выявлено восстановление белоксинтетической функции печени.

5.4. Оценка морфофункционального состояния печени животных после введения лизата клеток

С целью выяснения механизмов полученных эффектов при трансплантации разных комбинаций клеток дополнительно были проведены исследования по изучению влияния лизата этих клеток на изменение морфофункционального состояния печени на 7 сутки после частичной гепатэктомии. Лизат – это

бесклеточный экстракт, образовавшийся после разрушения клеток ферментативным путем. При оценке морфофункционального состояния печени на 7 сутки после частичной гепатэктомии получено, что введение лизатов клеток (ММСК, ММСК и ГСК, ММСК и ПКП) не приводит к изменению морфофункционального состояния печени (таблицы 82, 83).

Таблица 82

Показатели морфофункционального состояния печени зрелых лабораторных мышей на 7 сутки после частичной гепатэктомии, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение			
	NaCl	Лизат ММСК	Лизат ММСК+ГСК	Лизат ММСК +ПКП
Масса печени, г	1,68±0,11*	1,83±0,12*	1,77±0,18*	1,90±0,17*
Апоптотический индекс, ‰	1,25±0,09*	1,08±0,07*	1,17±0,10*	1,10±0,09*
Содержание гепатоцитов с микроядрами, ‰	2,77±0,23*	2,51±0,22*	2,66±0,24*	2,69±0,25*
Митотический индекс, ‰	4,51±0,47*	4,91±0,38*	4,66±0,35*	4,78±0,41*
Активность ферментов семейства PARP в клетках печени, MFI, усл. Ед.	59,3±5,2*	52,6±4,6*	60,3±5,1*	57,8±4,9*
Количество гепатоцитов На 1 мкм ²	1427,71±116,98	1512,57±132,78	1450,14±137,35	1492,27±124,1
Площадь гепатоцита (мкм ²)	286,41±22,44	274,29±24,90	270,86±23,55	293,2±24,2
Площадь цитоплазмы гепатоцита (мкм ²)	223,03±17,97	207,49±21,41	210,69±18,53	224,2±20,1
Площадь ядра гепатоцита (мкм ²)	63,39±5,12*	68,23±5,94*	66,17±6,97*	69,13±6,7*
Ядерно-цитоплазматический индекс	0,29±0,02*	0,33±0,02*	0,31±0,02	0,31±0,03
Количество двухъядерных гепатоцитов на 1 мм ²	320,77±10,64*	348,64±23,98*	338,71±20,10*	352,9±22,6*

Примечание:

$p < 0,05$ * с подгруппой сравнения зрелых животных

**Биохимические показатели крови мышей на 7 сутки после частичной
гепатэктомии**

Показатели		Значение			
		NaCl	Лизат ММСК	Лизат ММСК+ГСК	Лизат ММСК +ПКП
Показатели белкового обмена	общий белок (г/л)	44,27±3,62*	40,62±3,81*	45,2±4,12*	47,94±4,26*
	альбумин (г/л)	20,59±1,90*	22,6±2,1*	18,1±1,8*	23,5±2,0*
	мочевина (ммоль/л)	4,57±0,46*	4,62±0,40*	4,73±0,43*	4,48±0,38*
Показатели цитоллиза	аспартатаминотранс фераза (Е/л)	153,86±16,96*	162,6±16,01*	148,4±14,82*	173,7±16,7*
	аланинаминотрансф ераза (Е/л)	137,10±16,29*	144,1±15,22*	152,5±16,47*	132,8±13,42*
Показатель холестаза	щелочная фосфатаза (Е/л)	83,11±5,93*	79,6±6,83*	90,2±8,57*	85,4±8,21*
Глюкоза, ммоль/л		4,30±0,29*	4,43±3,72*	4,26±3,97*	4,58±4,22*
Общий билирубин, мкмоль/л		15,41±2,76*	16,2±1,89*	16,9±2,01*	15,30±1,73*

Примечание: $p < 0,05$ * с подгруппой сравнения зрелых животных;

Заключение к главе 5

Проведенные исследования показали, что проведение сочетанной трансплантации двух видов клеток: ММСК и ПКП зрелым и старым животным не оказывает влияния на физиологическую регенерацию печени. В условиях частичной гепатэктомии котрансплантация ММСК и ПКП способствует восстановлению морфофункционального состояния печени. При этом выявлены преимущества данной сочетанной трансплантации по сравнению с введением только ММСК. Так, уже на 3 сутки после частичной гепатэктомии введение ММСК и ПКП зрелым животным приводит к повышению массы печени зрелых и старых животных (рисунок 41).

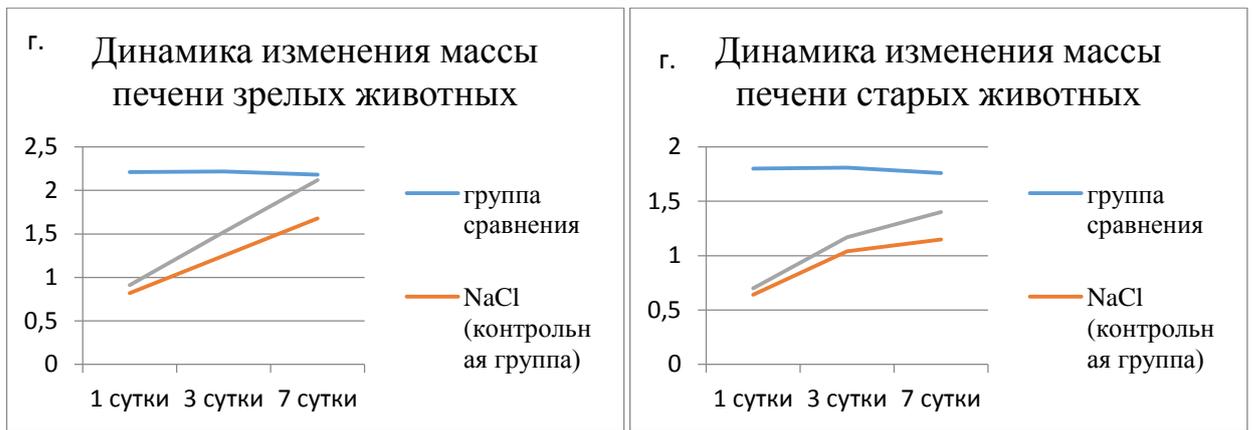


Рис. 41. Динамика изменения массы печени зрелых и старых животных.

Восстановление массы печени произошло за счет повышения митотической активности гепатоцитов, снижения запрограммированной клеточной гибели. Увеличение митотического индекса сопровождается повышенным количеством HGF после проведения котрансплантации ММСК и ПКП. Известно, что фактор роста гепатоцитов является митогеном для гепатоцитов [2, 70, 310]. ПКП, также как и ММСК, синтезируют этот фактор и, таким образом, способствуют повышению митотической активности гепатоцитов [9, 62, 179, 278]. У старых животных не произошло повышения митотической активности гепатоцитов при трансплантации ММСК и ПКП. Это обусловлено особенностями регенерации печени при старении. Известно, что при старении снижается хоуминг стволовых клеток, снижается их способность к дифференцировке, уменьшается чувствительность к факторам роста [5, 121, 282, 289]. Также при старении уменьшается количество образующейся АТФ. В условиях сниженного энергообразования механизмы регенерации в печени реализуются менее энергозатратным путем [3, 10, 19, 37]. У старых животных котрансплантация ММСК и ПКП в условиях частичной гепатэктомии привела к увеличению количества двуядерных гепатоцитов, увеличению размеров ядра.

Изменению морфометрических показателей печени при сочетанном введении ММСК и ПКП соответствовали изменения со стороны показателей крови в условиях резекции печени. В отличие от изменений, выявленных при введении только ММСК, проведение котрансплантации способствовало

восстановлению белковосинтетической функции печени у зрелых и старых лабораторных животных (рисунок 44).

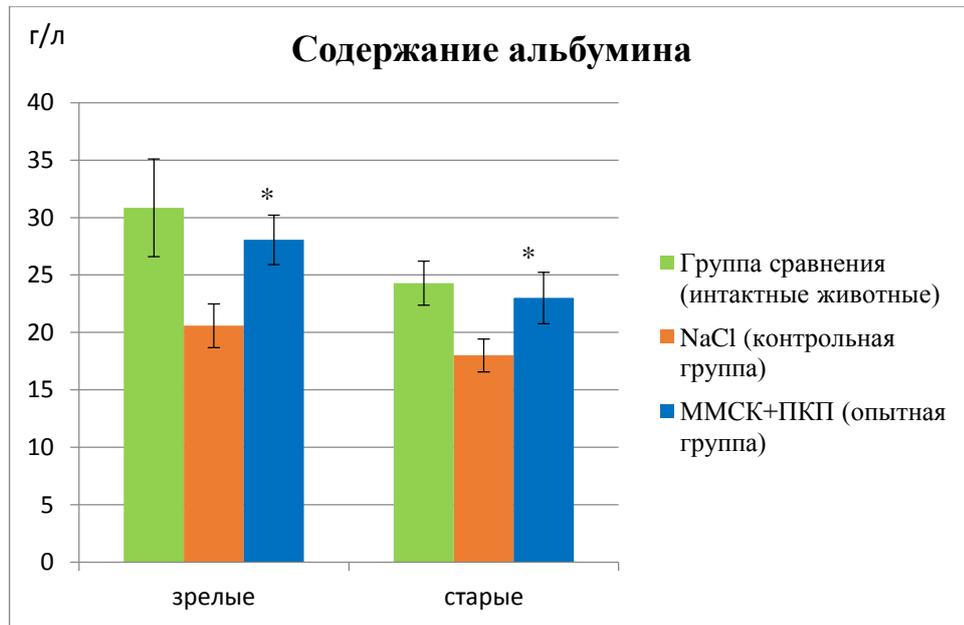


Рис. 44. Показатели белкового обмена зрелых и старых лабораторных животных на 7 сутки после резекции печени

В зрелом организме в условиях частичной гепатэктомии изучаемая трансплантация клеток обеспечивает также коррекцию углеводного обмена, уменьшению активности ферментов цитолиза (АСТ, АЛТ) и холестаза (ЩФ) (рисунок 45).

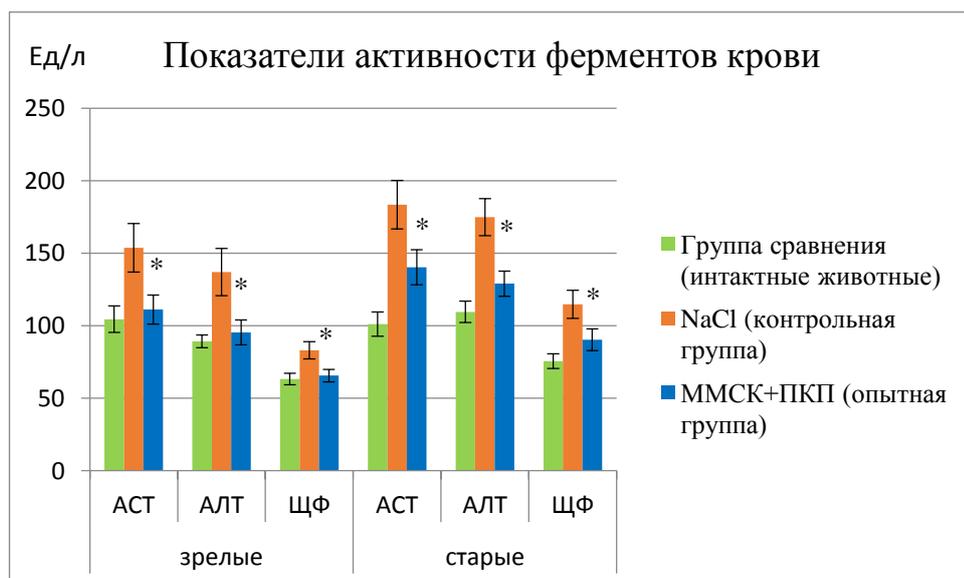


Рис. 45. Показатели активности ферментов крови зрелых и старых лабораторных животных на 7 сутки после резекции печени

Восстановление функции гепатоцитов (белоксинтетическая, регуляция уровня глюкозы в крови) также может быть связано с повышением уровня фактора роста гепатоцитов. Этот фактор действует как митоген и способен стимулировать пролиферацию гепатоцитов [18, 310]. Известно, что ПКП, как и ММСК, синтезируют этот ростовой фактор [70, 203].

В условиях токсического повреждения тетрахлорметаном котрансплантация ММСК и ПКП также способствовала восстановлению морфофункционального состояния печени, как и введение только ММСК.

Таким образом, сочетанная трансплантация ММСК и ПКП имеет преимущества перед введением других комбинаций клеток в условиях резекции печени.

Исследования, проведенные с клеточными лизатами, позволили доказать, что полученные при трансплантации клеток эффекты обусловлены не действием продуктов распада клеток, а обеспечиваются действием самих клеток.

ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последние несколько десятилетий клеточная трансплантационная терапия превратилась в потенциальный инструмент регенеративной медицины. Доклинические исследования показали многообещающие результаты в отношении лечения широкого спектра заболеваний [1, 36, 74, 112, 172, 243]. В настоящее время исследователи продолжают продвигать технологии клеточной терапии в клинических испытаниях [88, 231, 267, 304]. Однако, несмотря на имеющиеся достижения, все еще остаются нерешенными вопросы о том, какие типы клеток и тканевые источники наиболее полезны для конкретных терапевтических целей (например, замена поврежденной ткани, модуляция эндогенных реакций организма и т.д.). При этом принципиально важным является вопрос о значении состояния организма, прежде всего возраста реципиента, так как при старении происходят не только количественные, но и качественные изменения численности стволовых клеток с тенденцией их снижения с возрастом [19, 86, 189]. При этом падает способность стволовых клеток к самообновлению и дифференцировке. С одной стороны это ведет к истощению пула стволовых клеток, а с другой – к уменьшению количества выделяемых ими регуляторных факторов [52, 87].

Как известно, патология печени, сопровождающаяся нарушением регенерации, занимает высокое место в структуре заболеваемости [23, 54, 81, 306, 314]. В связи с этим представлялось важным изучить возможность активации регенерации печени, как при ее повреждении, так и в условиях возрастной инволюции. В этом плане перспективным для коррекции процессов старения является применение стволовых клеток, которые обладают способностью активировать синтез факторов роста, необходимых для поддержки дифференцировки и пролиферации клеток, приводящее к восстановлению нарушенных при старении функций органов и систем. На данный момент в отечественной и зарубежной литературе имеются лишь немногочисленные и

порой противоречивые теоретические предположения о возможном применении разных видов стволовых клеток с целью коррекции регенерации печени при старении [17, 37, 43, 65, 87, 189]. При этом вопросы комбинированного применения различных видов стволовых клеток (ММСК+ГСК, ММСК+ПКП) остаются неисследованными. В связи с вышеизложенным целью настоящей работы явилось изучение особенностей изменений морфофункционального состояния печени зрелого и старого организма после аллогенной трансплантации разных комбинаций клеток: мультипотентных мезенхимальных стромальных, сочетанной трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных и гемопоэтических стволовых клеток, котрансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных и перисинусоидальных клеток печени. Для достижения данной цели были поставленные серии экспериментов по введению комбинаций этих клеток в физиологических условиях и в условиях повреждения печени. Трансплантация ГСК и ПКП осуществлялась вместе с ММСК с целью исключения иммунологических конфликтов. Котрансплантация этих клеток совместно с ММСК позволяет избежать этих осложнений. Это обеспечивается иммуносупрессивными свойствами ММСК [118, 143, 186, 214], а также со способностью их к синтезу SDF-1, который регулирует приживление ГСК и ПКП в печени при ее повреждении [139, 267, 288].

Для оценки механизмов действия трансплантированных клеток было исследовано направленное движение мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, гемопоэтических стволовых клеток и перисинусоидальных клеток печени в физиологических условиях и при повреждении печени, вызванном частичной гепатэктомией и введением четыреххлористого углерода. Для выбора оптимального способа трансплантации клеток были использованы разные пути их введения: в хвостовую вену, в печеночную артерию, портальную вену, внутривенно.

Для изучения хоуминга производилось мечение клеток с помощью флуоресцентных красителей. При этом ММСК окрашивались акридиновым оранжевым, ГСК и ПКП - CFDA SE (5-(and 6)-Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester). При анализе содержания трансплантированных клеток в печени установлено, что наименьшее их число обнаруживается при внутрибрюшинном введении. Это свидетельствует о том, что данный способ является наименее эффективным для доставки клеток в печень. В то же время при введении клеток в хвостовую вену, портальную вену, печеночную артерию количество мигрировавших клеток в печень было практически одинаковым. Это определило выбор способа трансплантации клеток в нашем исследовании – в хвостовую вену, так как этот способ еще и не сопряжен с хирургическим вмешательством.

Проведенные исследования позволили установить, что при повреждении печени в ней обнаруживается значительно большее количество трансплантированных клеток по сравнению с физиологическими условиями. Это свидетельствует о способности вводимых клеток к направленной миграции в печень при ее повреждении, что может быть обусловлено повышенной выработкой стромальными клетками печени хемоаттрактанта (SDF - stromal cell – derived factor 1, CXCL 12). SDF-1 играет важную роль в самонаведении, миграции, пролиферации, дифференцировке и выживании клеток, экспрессирующих на своей поверхности его рецептор – CXCR4 [218, 310]. Трансплантируемые клетки: ММСК, ГСК, ПКП имеют на своей мембране рецептор - CXCR4 к этому лиганду, что способствует их направленному движению в поврежденный орган, ткань [70, 79, 209, 302]. Следует отметить, что этот хемоаттрактант стимулирует миграцию в печень не только аллогенных, но и аутологичных клеток организма. Также в регуляции миграции клеток участвуют insulin-like growth factor 1 (IGF-1) [139], ИЛ-8, HGF, ММП [269].

Следующим этапом работы было исследование влияния трансплантации ММСК на морфофункциональное состояние печени в физиологических условиях и при ее токсическом повреждении.

В качестве модели повреждения печени выбрано два варианта: первый – частичная гепатэктомия, и второй - однократное введение 50% масляного раствора четыреххлористого углерода. Для количественной оценки выраженности воспалительных явлений в печени в настоящем исследовании нами был предложен индекс воспалительной активности, включающий оценку некроза, дистрофии гепатоцитов, воспалительной инфильтрации в печени. Параллельно проводили оценку морфометрических показателей печени: митотический и апоптотический индексы, количество гепатоцитов на единицу площади, размер гепатоцитов, размер ядра гепатоцитов, ядерно-цитоплазматический индекс, количество двуядерных гепатоцитов на единицу площади, а также количества патологических митозов по микроядерному тесту. Для оценки интенсивности репаративных процессов ДНК в клетках печени производился анализ активности ферментов репарации семейства PARP (поли(АДФ-рибоза)-полимераза). Для функциональной оценки печени производили анализ биохимических показателей крови: определение содержания альбумина, мочевины, общего билирубина, АСТ, АЛТ, щелочной фосфатазы, фибриногена.

В отдельной серии опытов установлено, что трансплантация только ММСК интактным зрелым и старым лабораторным животным не приводит к изменениям морфофункционального состояния печени. Также не произошло изменения содержания гепатоцитов с микроядрами в обеих возрастных группах. Это свидетельствует о том, что введение ММСК не влияет на уровень патологических митозов в гепатоцитах. Установлено, что трансплантация ММСК не изменяет запрограммированную клеточную гибель и активность ферментов репарации ДНК семейства PARP. Полученные данные можно объяснить тем, что, несмотря на высокую функциональную активность печени, митотическая активность

гепатоцитов в физиологических условиях ограничена. Поэтому введение ММСК не вызывает изменений морфофункционального состояния интактной печени.

В следующей серии опытов при частичной гепатэктомии наблюдали уменьшение массы печени, повышение митотического и апоптотического индексов, увеличение уровня патологических митозов. Напротив, после резекции печени введение ММСК зрелым и старым животным приводит к восстановлению массы органа.

Однако механизмы восстановления массы печени в зрелом и старом организме имеют некоторые отличия. У зрелых лабораторных животных восстановление структуры органа достигается за счет активации митотической активности гепатоцитов ингибирования апоптоза, в то время как у старых лабораторных животных - лишь за счет ингибирования апоптоза. Повышение пролиферативной активности гепатоцитов резецированной печени зрелых животных после введения ММСК связано со способностью ММСК к выработке фактора роста гепатоцитов (HGF - Hepatocyte growth factor), который взаимодействует с рецептором HGFR/c-Met (mesenchymal-epithelial transition factor) (трансмембранная тирозиновая киназа), экспрессирующимся в клетках печени [18, 20, 55, 310]. Активация данного рецептора вызывает повышение пролиферации гепатоцитов [34, 35, 39, 292]. Проведенные исследования позволили установить, что трансплантация ММСК приводит к повышению уровня фактора роста гепатоцитов в сыворотке крови зрелых животных. В старом организме снижается чувствительность рецепторов к факторам роста, что и привело к отсутствию эффекта от введения ММСК на содержание HGF и на показатель митотического индекса у старых животных.

Угнетение запрограммированной клеточной гибели гепатоцитов можно связать со способностью ММСК через формирование межклеточных контактов индуцировать в гепатоцитах выработку белков теплового шока, которые, в свою очередь, повышают устойчивость структурных и функциональных белков [148,

216, 297]. Антиапоптогенный эффект достигается за счет повышения устойчивости ферментов, участвующих в репарации повреждений ДНК. Это подтверждается выявленным в ходе исследования повышением активности ферментов репарации ДНК семейства PARP в обеих возрастных группах.

Введение ММСК зрелым и старым животным приводит к повышению количества двухъядерных гепатоцитов. Это может быть результатом полиплоидизирующих митозов [3, 12, 14, 263]. Редуцирование митотического цикла (отсутствие цитотомии) не сопровождается секрецией многих регуляторных белков, а значит, энергии расходуется меньше, чем для полного митоза. Сокращение интенсивности митоза приводит к удлинению активной жизни клетки. При этом секреторная активность полиплоидной клетки становится выше, чем у диплоидных клеток.

После частичной гепатэктомии у зрелых и старых лабораторных животных отмечается повышение активности ферментов, характеризующих цитолиз гепатоцитов (АСТ, АЛТ), и холестаза (ЩФ), нарушение белковосинтетической функции печени со снижением содержания общего белка, альбумина, мочевины, фибриногена.

Трансплантация ММСК зрелым и старым животным приводит к снижению активности ферментов цитолиза и холестаза, что может быть связано со способностью их к синтезу противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-10) [53, 139, 203, 267]. Вследствие этого происходит снижение проницаемости клеточных мембран, что сопровождается нормализацией активности ферментов сыворотки крови – АСТ, АЛТ, ЩФ.

Следующим вариантом моделирования повреждения печени явилось введение тетрахлорметана, которое сопровождалось появлением в печени ступенчатых и мостовидных некрозов гепатоцитов, расширением портальных вен, дистрофией гепатоцитов, появлением воспалительной инфильтрации. У старых животных выраженность воспалительной реакции в печени была достоверно

больше по сравнению со зрелыми животными. Эти изменения обусловлены особенностями метаболизма четыреххлористого углерода, который подвергается воздействию микросомальных оксидаз с последующим образованием свободных радикалов ($\text{CCl}_3\cdot$ и $\text{Cl}\cdot$). Это приводит к активации перекисного окисления липидов и повреждению клеточных структур [78, 157, 176, 199, 211]. При старении происходит увеличение соотношения ПОЛ/АОА в результате снижения антиоксидантной активности [107]. Это сопровождается накоплением свободных радикалов, образующихся в результате метаболизма тетрахлорметана, что приводит к более выраженной активности воспаления в печени у старых животных.

У зрелых и старых животных введение тетрахлорметана привело к уменьшению размеров гепатоцитов, что может быть связано с потерей гликогена гепатоцитами, а также с изменениями, происходящими в эндоплазматической сети, митохондриях, лизосомах [242, 284]. Наряду с этим по данным микроядерного теста увеличивается число патологических митозов.

После введения тетрахлорметана произошло увеличение количества двуядерных гепатоцитов, что можно объяснить тем, что в ранние сроки репаративной регенерации значительная часть митозов является ацитокинетическими [3]. Такой путь является энергетически более выгодным для клетки, в условиях, когда орган функционирует на пределе своих возможностей, избегая энергоемкого процесса деления клеток.

В обеих возрастных группах выявлено нарушение белкосинтетической функции печени, нарушение углеводного обмена, повышение активности ферментов цитолиза (АСТ, АЛТ). Проявлением дестабилизации мембран также является признак синдрома холестаза – повышение активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови.

Введение ММСК зрелым и старым животным с токсическим повреждением печени способствовало снижению интенсивности воспалительного процесса в

печени, что проявилось уменьшением индекса воспалительной активности. Это обусловлено способностью ММСК к синтезу противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-10) [64, 267, 280, 302], что привело к ограничению зон некроза и снижению дистрофии гепатоцитов.

При анализе морфометрических показателей печени получено, что введение ММСК на фоне острого токсического повреждения печени приводит к смещению соотношения между пролиферацией и апоптозом в сторону пролиферации - отмечается активация митотической активности гепатоцитов и снижается интенсивность запрограммированной клеточной гибели. Возрастные особенности влияния ММСК на морфометрические показатели печени при ее токсическом повреждении заключаются в том, что старые животные в ранние сроки отвечают на введение ММСК лишь увеличением количества двухъядерных гепатоцитов, увеличением размеров ядра, в то время как у зрелых животных, наряду с указанными изменениями также отмечается и активация пролиферативной активности гепатоцитов. Обнаруженные возрастные особенности механизмов регенерации могут быть связаны с изменениями временных параметров митотического цикла гепатоцитов. По данным литературы известно, что в старом организме отмечается увеличение продолжительности премитотического периода (G2) [86, 87], что определяет более поздний пролиферативный ответ на введение ММСК. В то же время известно, что при старении происходит снижение чувствительности стволовых клеток к стимулирующим их пролиферацию и дифференцировку факторам роста [19, 103, 174]. С этих позиций можно объяснить более высокую митотическую активность и, как следствие, увеличение количества гепатоцитов у зрелых животных.

Также после введения ММСК зрелым и старым животным с токсическим повреждением печени выявлено снижение запрограммированной клеточной гибели гепатоцитов. Это может быть связано со способностью ММСК индуцировать в клетках печени выработку белков теплового шока [216, 273, 297].

Такие белки способны поддерживать исходную конформацию белков, повышать устойчивость ферментов репарации (белки репарации семейства PARP), что приводит к исправлению нарушений в молекуле ДНК. Это подтверждается выявленным в ходе исследования увеличением активности ферментов семейства PARP у зрелых и старых животных после введения ММСК. Уменьшение количества мутаций в молекуле ДНК приводит к снижению содержания иницирующих, эффекторных каспаз, и, как следствие, к снижению апоптоза. Увеличение устойчивости ферментов репарации также способствует снижению количества клеток с микроядрами.

На фоне проведенной трансплантации ММСК у зрелых и старых лабораторных животных снижается и активность ферментов цитолиза и холестаза, что связано со способностью ММСК вырабатывать противовоспалительные цитокины [267, 280, 302].

У зрелых животных после введения ММСК при токсическом повреждении печени отмечено восстановление белковосинтетической функции печени. Это может быть связано со способностью ММСК к синтезу фактора стволовых клеток (SCF-stem cell factor), который, взаимодействуя с рецептором c-KIT (CD 117) на поверхности перисинусоидальных клеток печени, способствует их пролиферации и дифференцировке в гепатоциты [70, 182]. Старение сопровождается снижением способности стволовых клеток к дифференцировке, снижается пролиферативный потенциал клеток, в связи с этим у старых лабораторных животных не происходит восстановления белкового обмена.

Следующим этапом исследования было изучение влияния сочетанной трансплантации ММСК и ГСК на морфофункциональное состояние печени в физиологических условиях и при ее повреждении, вызванном резекцией печени и введением четыреххлористого углерода. Выбор именно этих видов клеток был обусловлен их биологическими особенностями. Известно, что ММСК вырабатывают хемоаттрактант для ГСК - SDF-1 (stromal derived factor 1), который

усиливает хоуминг трансплантированных и аутологичных ГСК в поврежденную ткань [218]. В литературе имеются данные, свидетельствующие о том, что ГСК способствуют пролиферации гепатоцитов и репарации печени после ее повреждения [62, 194, 256]. Ряд исследователей утверждает о способности ГСК трансдифференцироваться в гепатоциты [209, 261]. В последние годы доказана способность ГСК стимулировать морфофункциональное состояние печени путем слияния с гепатоцитами (fusion-effect) [236]. Выработка ММСК иммуносупрессивных факторов снижает возможность развития иммунологических конфликтов при проведении аллогенной трансплантации клеток. ММСК способны ускорить процесс приживления ГСК и, соответственно, активации регенерации печени.

Проведение сочетанной трансплантации ММСК и ГСК зрелым и старым интактным животным не привело к изменению биохимических показателей крови и морфометрических показателей печени. Таким образом, сочетанное введение этих видов клеток не влияет на процесс физиологической регенерации печени у таких животных.

При котрансплантации ММСК и ГСК при повреждении печени нами выявлен стимулирующий эффект. Важно отметить, что при токсическом повреждении печени ММСК и ГСК оказали более выраженное стимулирующее влияние на восстановление морфофункционального состояния печени, чем введение только ММСК. Так, при оценке индекса воспалительной активности в печени при ее токсическом повреждении получено, что котрансплантация ММСК и ГСК способствовала снижению индекса воспалительной активности за счет уменьшения дистрофии гепатоцитов, снижения выраженности воспалительной инфильтрации у зрелых и старых животных (рисунок 46). У зрелых животных также произошло ограничение зон некроза гепатоцитов. Это может быть связано со способностью ГСК к синтезу TGF- β при стимуляции провоспалительными цитокинами [256]. Введение тетрахлорметана сопровождается выраженной

воспалительной реакцией в печени с выделением спектра провоспалительных цитокинов [157, 207, 233].

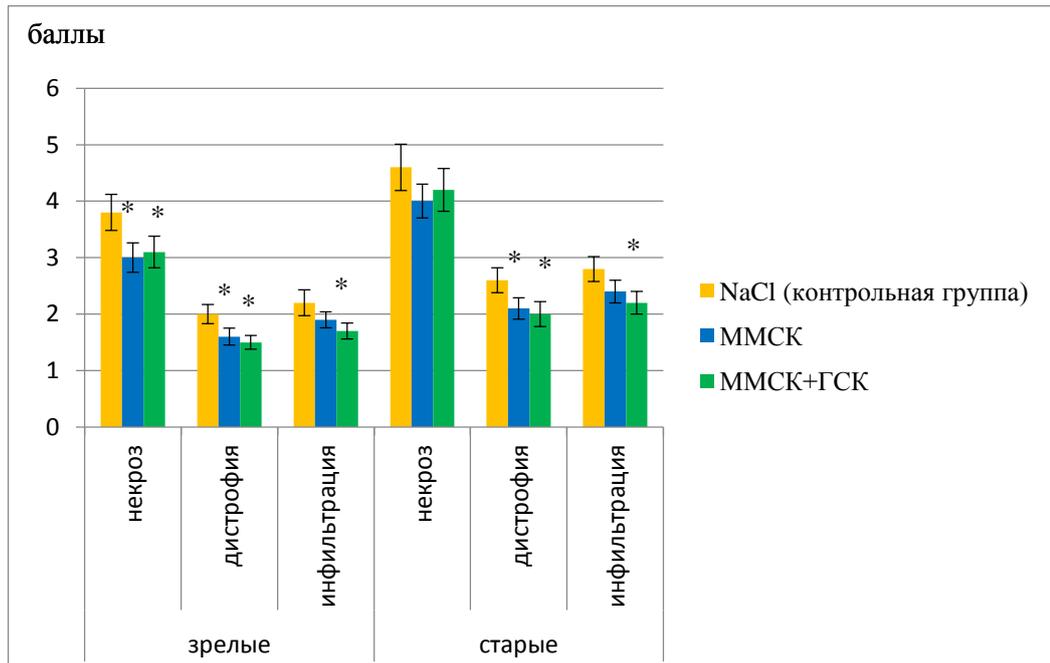


Рис. 46. Показатели выраженности воспалительной реакции в печени зрелых и старых мышей на 7 сутки после введения клеток

Котрансплантация ММСК и ГСК вызывала повышение митотической активности гепатоцитов зрелых животных уже на 1 сутки, чего не наблюдалось при введении только ММСК (рисунок 47).

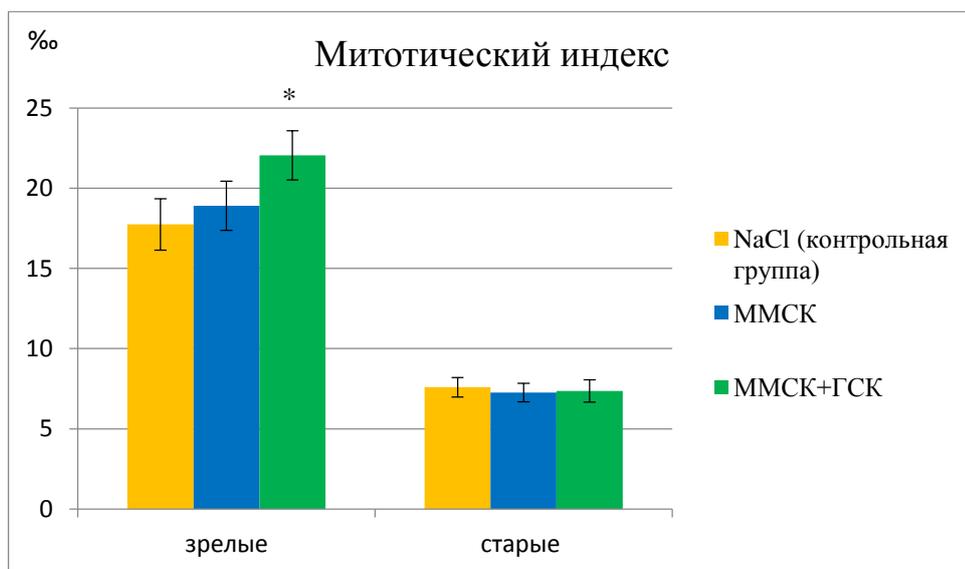


Рис. 47. Изменение митотической активности гепатоцитов на 1 сутки после введения тетрахлорметана

Также котрансплантация ММСК и ГСК привела к увеличению количества двухъядерных гепатоцитов в обеих возрастных группах. Выявленное повышение образования двухъядерных гепатоцитов у зрелых и старых животных создает резерв полиплоидизации [86, 89]. В двухъядерной клетке возрастает количество РНК и интенсифицируется белковый обмен. В наших опытах это нашло подтверждение при анализе биохимических показателей крови. У зрелых животных сочетанное введение ММСК и ГСК на фоне токсического повреждения печени привело к нормализации белкосинтетической функции печени – произошло восстановление содержания альбумина в крови. Напротив, у старых животных изменения показателей белкового обмена не обнаружены.

Проведение сочетанной трансплантации ММСК и ГСК при токсическом повреждении печени уже на 1 сутки приводит к снижению активности ферментов в крови зрелых животных. Подобные изменения не наблюдались при введении только ММСК (рисунок 48).

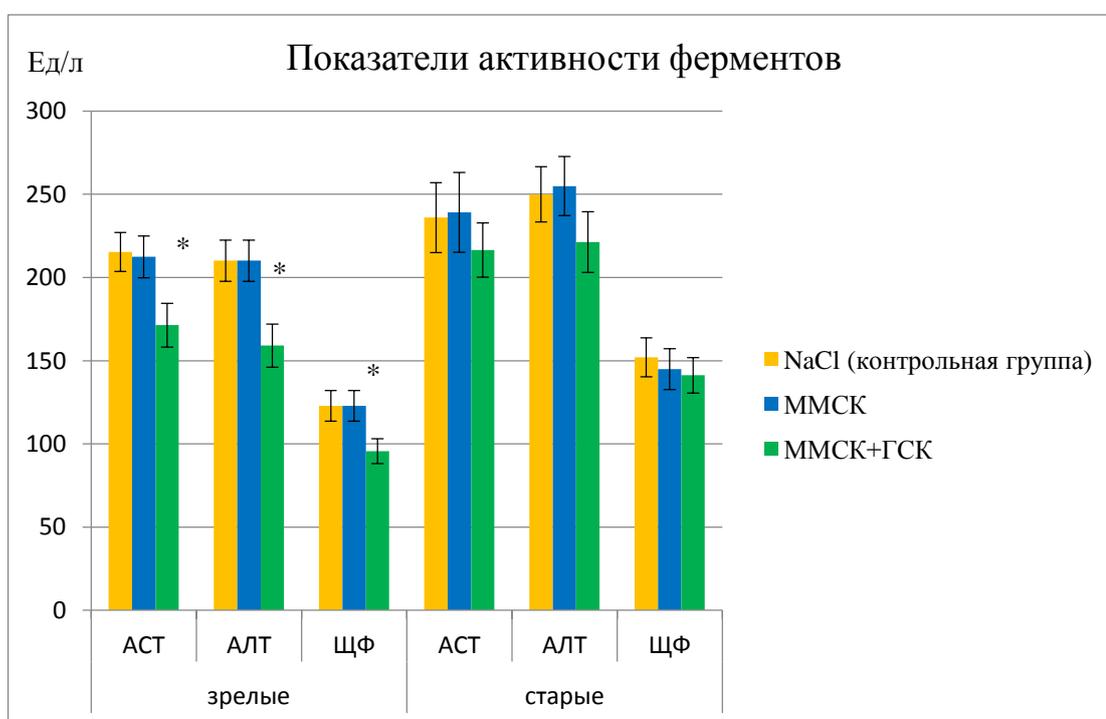


Рис. 48. Показатели активности ферментов крови зрелых и старых животных на 1 сутки после резекции печени

При частичной гепатэктомии сочетанная трансплантация ММСК и ГСК привела к сходным изменениям морфофункционального состояния печени, что наблюдалось при введении только ММСК.

Котрансплантация ММСК и ГСК при токсическом повреждении способствовала более выраженному эффекту, по сравнению с резекцией печени в связи с тем, что количество мигрировавших ГСК в печень было выше на 85% у зрелых животных и на 76% у старых. Это связано с тем, что основным хемоаттрактантом для ГСК является SDF-1, продукция которого непосредственно связана с повреждением органа. Токсическое повреждение печени характеризуется большим повреждением тканей органа, чем частичная гепатэктомия, что и влечет за собой большую выработку SDF-1. Мигрировавшие аллогенные и аутологичные ГСК реализуют свое действие через fusion-effect и путем трансдифференцировки.

В специальной серии экспериментов исследовали сочетанное воздействие аллогенной трансплантации ММСК и ПКП на морфофункциональное состояние печени в физиологических условиях и при ее патологии. Известно, что значительная роль в регенерации печени отводится перисинусоидальным клеткам печени [62, 70, 182]. Эти клетки формируют микроокружение гепатоцитов, образуя коллагены IV, VI, IVX типов, гликопротеины, протеогликаны [70, 197]. При патологии печени ПКП вырабатывают митогены для гепатоцитов – фактор роста гепатоцитов (HGF), фактор стволовых клеток (SCF), эпиморфин, плейотрофин [278, 315].

Также известно, что и ММСК способны к выработке SCF, который способствует повышению пролиферативной активности ПКП [91, 193]. Учитывая биологические особенности взаимодействия ММСК и ПКП, представлялось перспективным использовать сочетанную трансплантацию этих видов клеток для восстановления морфофункционального состояния печени в условиях ее повреждения.

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что сочетанная трансплантация ММСК и ПКП не влияет на интактную печень. При сочетанном введении ММСК и ПКП зрелым и старым животным в условиях частичной гепатэктомии выявлено более значимое восстановление морфофункционального состояния печени по сравнению с введением только ММСК или котрансплантации ММСК и ГСК.

Так, уже на 3 сутки после котрансплантации ММСК и ПКП происходит повышение митотической активности (рисунок 49) и повышение массы печени гепатоцитов зрелых животных (рисунок 50).

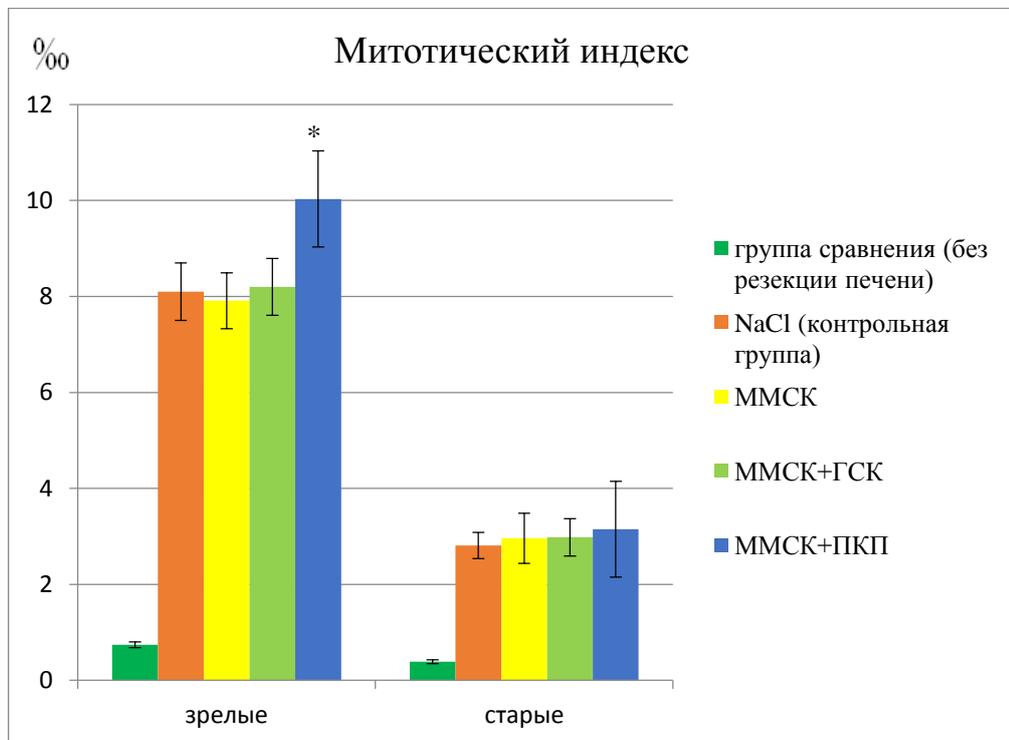


Рис. 49. Митотический индекс гепатоцитов на 3 сутки после частичной гепатэктомии

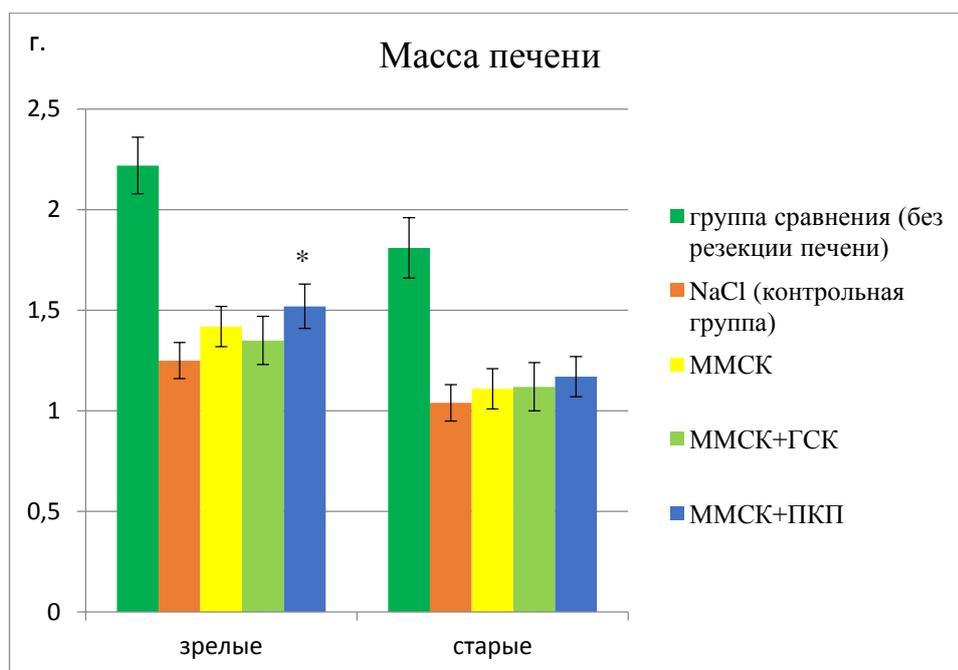


Рис. 50. Масса печени на 3 сутки после частичной гепатэктомии

Эти изменения могут быть связаны с обнаруженным в ходе исследования повышением уровня HGF в плазме крови (рисунок 51). К синтезу фактора роста гепатоцитов способны и MMCK, и ПКП, что приводит к наибольшему увеличению его уровня при сочетанном введении MMCK и ПКП. HGF обладает выраженным митогенным и морфогенным эффектом, что способствовало активации митотической активности гепатоцитов и, в результате, повышению массы печени.

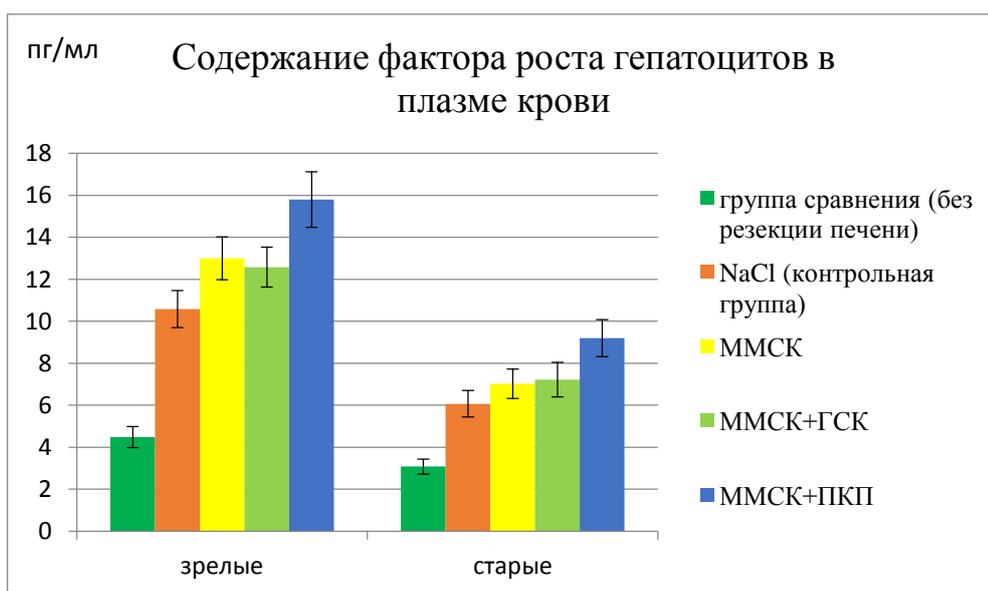


Рис. 51. Содержание HGF на 7 сутки после частичной гепатэктомии

Изменению морфологического состояния печени соответствуют биохимические изменения крови. Уже на 1 сутки после частичной гепатэктомии у зрелых животных отмечается снижение уровня ферментов, характеризующих цитолиз гепатоцитов и холестаза. При введении других изучаемых видов клеток этот эффект не был выявлен. У старых животных снижение активности ферментов при котрансплантации ММСК и ПКП в условиях резекции печени появляется к 3 суткам.

Проведенные исследования свидетельствуют, что введение ММСК и ПКП (в отличие от других изучаемых трансплантаций) привело к восстановлению белковосинтетической функции печени и у зрелых, и у старых животных (рисунок 52).

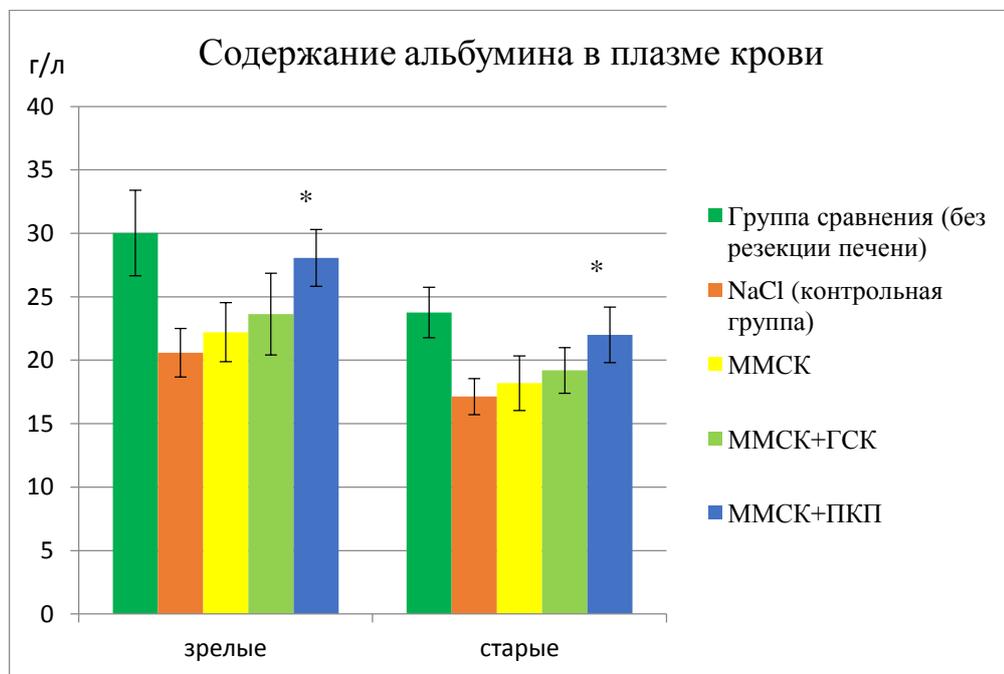


Рис. 52. Содержание альбумина в плазме крови зрелых и старых животных на 7 сутки после резекции печени

Таким образом, стимулирующее влияние ПКП на восстановление морфофункционального состояния печени выявлено при частичной гепатэктомии, в то время как при токсическом повреждении печени эффект от котрансплантации ММСК и ПКП не отличался от действия ММСК или сочетанного введения ММСК и ГСК. Можно предположить, что «окружающая среда контролирует»

поведение трансплантированных ПКП. Поддержанию стволовых свойств последних (нахождение их в недифференцированном состоянии) способствует их микроокружение. Токсическое повреждение печени сопровождается некрозом гепатоцитов, выделением провоспалительных цитокинов, изменением состава внеклеточного матрикса, нарушением взаимодействий между ПКП и гепатоцитами. Это приводит к изменению функционального состояния ПКП, они утрачивают пластические и регуляторные функции стволовых клеток, но приобретают миофибробластоподобный фенотип. Таким образом, при токсическом повреждении печени введение ПКП не оказало стимулирующего влияния на восстановление морфофункционального состояния печени.

В целом, проведенные исследования на зрелых и старых животных с использованием разных сочетаний клеток позволили доказать, что изучаемые виды клеток не влияют на морфофункциональное состояние печени интактных животных. В то же время при повреждении печени трансплантируемые клетки способны активировать в ней восстановительные процессы: ингибировать апоптоз, повышать митотическую активность, увеличивать количество двуядерных клеток, снижать количество гепатоцитов с микроядрами, активировать ферменты репарации семейства PARP.

Эти эффекты реализуются в значительной степени через установленный нами механизм – активацию ферментов репарации ДНК. В результате клетка получает дополнительное время на исправление повреждений в структуре ДНК. Это приводит к сохранению тканевого гомеостаза, снижению запрограммированной клеточной гибели.

В проведенном исследовании выявлены особенности механизмов репаративной регенерации в зрелом и старом организме в ответ на трансплантацию изучаемых клеток. В зрелом возрасте преимущественно происходит активация митотической активности и ингибирование апоптоза, тогда как в старом – только угнетение запрограммированной клеточной гибели.

В ходе исследования установлено, что эффект на репаративную регенерацию зависит от характера повреждения, от вида трансплантируемых клеток и от возраста организма. Так в условиях токсического повреждения печени более выраженный эффект в отношении активации репаративной регенерации выявлен после сочетанной трансплантации ММСК и ГСК. В условиях частичной гепатэктомии более эффективной является применение сочетанной трансплантации ММСК и ПКП.

ВЫВОДЫ

1. Использование ММСК, сочетанной трансплантации ММСК и ГСК, а также котрансплантации ММСК и ПКП сопровождается ускорением восстановления морфофункционального состояния печени в условиях ее частичной гепатэктомии и токсического повреждения.

2. Восстановление морфофункционального состояния печени после трансплантации ММСК, сочетанной трансплантации ММСК и ГСК, а также котрансплантации ММСК и ПКП при повреждении печени у зрелых лабораторных животных происходит вследствие активации митотической активности и ингибирования апоптоза, тогда как у старых животных – преимущественно вследствие угнетения запрограммированной клеточной гибели.

3. После частичной гепатэктомии сочетанная трансплантация ММСК и ПКП оказывает более выраженный эффект в отношении восстановления структуры и функции печени по сравнению с введением ММСК, котрансплантации ММСК и ГСК, главным из которых является восстановление белковосинтетической функции печени.

4. При токсическом повреждении печени сочетанная трансплантация ММСК и ГСК оказывает более выраженный позитивный эффект в отношении восстановления структуры и функции печени по сравнению с введением ММСК, а также сочетанным введением ММСК и ПКП, связанный с механизмами снижения цитолиза и активности воспаления.

5. Одним из важных механизмов восстановления морфофункционального состояния печени с участием ММСК является повышение активности ферментов репарации ДНК семейства PARP, приводящее к снижению запрограммированной клеточной гибели.

6. Восстановление морфофункционального состояния печени после трансплантации ММСК, сочетанной трансплантации ММСК и ГСК, а также котрансплантации ММСК и ПКП зависит как от возраста, так и от характера повреждения и имеет разнонаправленный характер.

УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АИ – апоптотический индекс

АПК - антигенпрезентирующая клетка

АСТ – аспартатаминотрансфераза

АЛТ - аланинаминотрансфераза

ГИМ - гемопозиндуцирующее микроокружение

Г-КСФ – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

ГСК – гемопозитическая стволовая клетка

ПКП – перисинусоидальная клетка печени

ИЛ – интерлейкин

КОЕ-ВПП - колониеобразующая единица высокого пролиферативного потенциала

КОЕ-Г - колониеобразующая единица гранулоцитарного ряда

КОЕ - М - колониеобразующая единица моноцитарного ряда

КОЕ-с - колониеобразующая единица селезенки

ЛПС - липополисахарид

МИ - митотического индекс

ММСК – мультипотентная мезенхимальная стромальная клетка

МЯТ – микроядерный тест

ПГ – простагландин

РТПХ – реакция трансплантат против хозяина

ЩФ – щелочная фосфатаза

CD - cluster of differentiation

ITGA - мембранный белок, гликопротеин из надсемейства интегринов интегрин альфа-2 (гликопротеин Ia/IIa тромбоцитов)

CXCR4 – хемокиновый рецептор - 4 тип.

FBS – фетальная бычья сыворотка

HGF – фактор роста гепатоцитов

HSP – белок теплового шока

IFN – γ – гамма интерферон

iNO-синтаза – индуцибельная NO-синтаза

MHC – главный комплекс гистосовместимости

NCAM – нейрональные молекулы клеточной адгезии

GFAP - Глиальный фибриллярный кислый протеин (glial fibrillary acidic protein - GFAP)

PARP – Поли(АДФ-рибоза)полимер

PBS - Phosphate buffered saline

PDGF – тромбоцитарный фактор роста

SCA-1 – антиген стволовой клетки-1

SCF – фактор стволовых клеток

SDF-1 – стромой вырабатываемый фактор-1

TNF – фактор некроза опухоли

TGF- β – трансформирующий фактор роста- β

VEGF – сосудисто-эндотелиальный фактор роста

МЕХАНИЗМЫ ВОССТАНОВЛЕНИЯ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ПЕЧЕНИ ПРИ ЕЕ ПОВРЕЖДЕНИИ С ПОМОЩЬЮ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК С УЧЕТОМ ВОЗРАСТНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ



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. Аллогенные гепатоциты в коррекции морфофункциональных нарушений в печени при воздействии постоянного магнитного поля / Е. С. Литвинова, В. Т. Дудка, Н. А. Быстрова, Н. А. Конопля // Системный анализ и управление в биомедицинских системах. – 2018. – Т.17. - № 2. – С. 289-295.
3. Аруин, Л. И. Структурные основы адаптации и компенсации нарушенных функций / Л. И. Аруин, А. Г. Бабаева, В. Б. Гельфанд; под ред. Д.С. Саркисова. – М.: Медицина, 1987. – 448 с.
4. Бабенко, В. А. Возраст донора и эффективность клеточной терапии / В. А. Бабенко, Д. Н. Силачев, К. В. Горюнов [и др.] // Клиническая геронтология. – 2019. – Т. 25. - № 9-10. – С. 43-44.
5. Бабенко, В. А. Физиологические особенности мультипотентных стромальных клеток, полученных от доноров разного возраста / В. А. Бабенко, Д. Н. Силачев, К. В. Горюнов [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2020. – Т. 22. - № 5. - С. 127-128.
6. Базарный, В. В. Характеристика гематологических параметров у реципиентов печени / В. В. Базарный, А. Ю. Максимова, Е. Н. Бессонова. / Вестник гематологии. - 2019. - Т. 15. - № 3. - С. 5.
7. Базарный, В. В. Клинико-диагностическое значение аутоантител к асиалогликопротеиновым рецепторам в диагностике аутоиммунных

- заболеваний печени / В. В. Базарный, Е. Ю. Михайлова, Е. А. Партылова // Медицинская иммунология. – 2015. – Т. 17. - № 1. – С. 93-96.
8. Базарный, В. В. Проблемы лабораторной диагностики цирроза печени / В. В. Базарный, Н. В. Гаренских // Новости Вектор-Бест. – 2013. – Т. 67. - № 1. – С. 9.
 9. Байдюк, Е. В. Сравнительный анализ морфофункциональных показателей культуры гепатоцитов, выделенных из нормальной и патологически измененной печени крыс / Е. В. Байдюк, А. П. Ширяева, Н. Н. Безбородкина [и др.] // Цитология. – 2009. – Т. 51. – №. 10. – С. 797–805.
 10. Бережков, Н. В. Структурные основы старения клеток печени и возрастные особенности их реактивности / Н.В. Бережков // Арх. патологии. – 1989. – Т.51. - №11. – С.40–47.
 11. Блинкова, Н. Б. Реакция тучных клеток на повреждение печени при аллоксановом диабете у крыс / Н. Б. Блинкова // Рос.иммунол.журнал. – 2016. – Т.10(19), №2(1). – С. 543–545.
 12. Блинкова, Н. Б. Полиплоидия гепатоцитов в регенерации печени при хроническом гепатите у пациентов из разных возрастных групп / Н. Б. Блинкова, С. В. Сазонов, С. Л. Леонтьев // Юника, Екатеринбург, 2017 – 106 с.
 13. Бозо, И. Я. Особенности мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, полученных из различных интраоральных источников / И. Я. Бозо, В. Л. Зорин, И. И. Еремин [и др.] // Гены & Клетки. – 2014. - № 9(4). – С. 34-42.
 14. Бродский, В. Я. Клеточная полиплоидия. Пролиферация и дифференцировка / В. Я. Бродский, И.В. Урываева. - М.: Наука. - 1981. - 259 с.

15. Буев, Д. О. Fusion-феномен в нормальном гистогенезе и при патологии: часть 1 / Д. О. Буев, А. М. Емелин, Р. В. Деев // Гены и клетки. – 2018. – Т. 13. – № 2. – С. 13-21.
16. Быков, В. Л. Цитология и общая гистология. Функциональная морфология клеток и тканей человека: учебник для студентов медицинских институтов / В. Л. Быков. - Санкт-Петербург : Сотис, 2016. - 520 с.
17. Ванюшин, Б. Ф. Молекулярно – генетические механизмы старения / Б. Ф. Ванюшин, Г. Д. Бердышев. – М.: Медицина. – 1977. – 296 с.
18. Влияние однократного введения экзогенного фактора роста гепатоцитов на показатели неспецифической резистентности в условиях пострезекционного повреждения печени / С.А. Лепехова, Л.В. Зарицкая, Е.В. Батунова [и др.] // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. - 2016. - № 1. – С. 49-55.
19. Возрастные особенности морфофункционального состояния гепатоцитов при репаративной регенерации у больных хроническим вирусным гепатитом / Н. Б. Крохина, С. В. Сазонов, А. П. Ястребов, А. В. Шешенина // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2007. – №1. – С. 67–70.
20. Газизов, И. М. 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.
21. Гальперин, Э. И. Возможности биологической комбинации, полученной из растущей печени, для ее восстановления при токсическом повреждении (экспериментальное исследование) / Э. И. Гальперин, Р. И. Атауллаханов, Т. Г. Дюжева [и др.] // Биомедицинская химия. – 2017. – Т. 63. - № 5. – С. 440-446.

22. Гистиоструктурные изменения печени и проявления синдрома эндогенной интоксикации при хронической HCV–инфекции / В. М. Борзунов, П. Л. Кузнецов, Н. Б. Крохина, Д. В. Русяков // *Фундаментальные исследования*. – 2012. – №12–2. – С. 223–227.
23. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц.- М.: Практика. - 1999. - 459с.
24. Гомзикова, М. О. Иммуномодулирующие свойства индуцированных микровезикул, полученных из мезенхимных стволовых клеток / М. О. Гомзикова, С. К. Клетухина, О. А. Неустроева [и др.] // *Гены и клетки*. – 2019. – Т. 14. - № 5. – С. 65.
25. Гоникова, З. З. Сравнительный анализ эффективности стимуляции процессов регенерации печени клетками костного мозга и общей РНК этих клеток / З. З. Гоникова, А. О. Никольская, Л. А. Кирсанова // *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. – 2019. – Т. 21. - № 1. – С. 113-121.
26. Гоникова, З. З. Общая РНК из клеток костного мозга ускоряет темп и повышает эффективность восстановительных процессов в печени после обширной резекции / З. З. Гоникова, А. О. Никольская, Л. А. Кирсанова [и др.] // *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. – 2019. Т. 21. – № 5. – С. 148.
27. Готье, С. В. Роль эндоваскулярных и эндобилиарных методов в лечении осложнений после трансплантации печени / С. В. Готье, М. А. Восканов, А. Р. Монахов // *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. – 2020. - Т. 22. - № 4. – С. 140-148.
28. Готье, С. В. Сплит – трансплантация печени: опыт одного центра / С. В. Готье, А. Р. Монахов, О. М. Цирульникова // *Альманах клинической медицины*. – 2020. - Т. 48. - № 3. – С. 162-170.

29. Григорян, А. С. Выделение мультипотентных прогениторных клеток из фетальной печени человека / А. С. Григорян // Гены и клетки. – 2006. – Т. 1. – №. 4
30. Гумерова, А. А. Звездчатые клетки печени стимулируют дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток костного мозга крысы в гепатоциты *in vitro* / А. А. Гумерова, А. К. Шафигуллина, А.А. Трондин [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Т. 6 - № 4. С. 72-81.
31. Данилова, И. Г. Влияние активации макрофагов на морфофункциональное состояние тучных клеток печени крыс с аллоксановым диабетом / И. Г. Данилова // Российский иммунологический журнал. – 2016. – Т.10(19), №3. – С. 244–245.
32. Дюжева, Т. Г. Влияние биологической комбинации (экстракт из растущей печени) на культуры клеток различного происхождения / Т. Г. Дюжева, М. В. Ковина, Л. В. Платонова [и др.] // Анналы хирургической гепатологии. – 2018. – Т. 23. - № 1. – С. 88-95.
33. Дюжева, Т. Г. Влияние экстракта из регенерирующей и растущей печени на токсическое повреждение печени *in vivo* и пролиферацию гепатоцитов в культуре клеток / Т. Г. Дюжева, Л. В. Платонова, А. Н. Куимов [и др.] // Гены и клетки. – 2017. – Т. 12. - № 3. – С. 113-120.
34. Ельчанинов, А. В. 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.
35. Ельчанинов, А. В. Экспрессия генов цитокинов и факторов роста в печени после субтотальной резекции у крыс /А. В. Ельчанинов, Т. Х. Фатхудинов, Е. Ю. Кананыхина [и др.] // Гены и клетки. – 2016. - 11(1). – С. 61–67.

36. Еремин, И. И. Сравнительная оценка терапевтической эффективности клеточных продуктов / И. И. Еремин, И. Н. Корсаков, А. П. Петрикина [и др.] // Гены и клетки. – 2019. – Т. 14. - № 5. – С. 88.
37. Журавлева, Л. В. Печень и возраст: взгляд на проблему врача– терапевта / Л. В. Журавлева, О. В. Лахно, О. И. Цивенко // – 2012.
38. Звездчатые клетки печени стимулируют морфофункциональное состояние печени крыс после частичной гепатэктомии на фоне подавления пролиферации гепатоцитов / А. А. Титова, Г. Р. Бурганова, Э. И. Шарипова [и др.] // Гены и Клетки. – 2014. – Т. 9. - № 3. – С. 131-135
39. Значение гистохимической и иммуногистохимической этиологической диагностики хронического вирусного гепатита В / Н. Б. Крохина, А. В. Шешенина, С. В. Сазонов, Н. А. Серов // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2009. – № 1. – С. 78–81.
40. Ильинский, И. М. Особенности морфологии биоптатов печени доноров старше 60 лет / И. М. Ильинский, Н. П. Можейко, Д. В. Воронов [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2019. – Т. 21. - № 4. - С. 36-40.
41. Иммунофизиология / В. А. Черешнев, Б. Г. Юшков, В. Г. Климин, Е. В. Лебедева – Екатеринбург: УрОРАН. – 2002. – с. 257.
42. Иноземцев, П. О. Современные методы коррекции и профилактики печеночной недостаточности / П. О. Иноземцев, Л. И. Федорова, С. А. Лепехова // Эффективная фармакотерапия. – 2020. – Т. 16. - № 1. – С. 46-51.
43. Калинин, А. Л. Морфологические и патофизиологические особенности печени у пожилых пациентов / А. Л. Калинин // Проблемы здоровья и экологии. – 2016. – №. 1 (47).

44. Клиническая морфология печени: некрозы / В. М. Цыркунов, Н.И. Прокопчик, В. П. Андреев, Р. И. Кравчук // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2017. - Том 15. - № 5. – С. 557-568.
45. Клиническая морфология печени: дисплазия, апоптоз, регенерация / В. М. Цыркунов, В. П. Андреев, Н. И. Прокопчик, Р. И. Кравчук // Гепатология и гастроэнтерология. – 2017. – Т. 1. - № 1. – С. 41-52.
46. Клиническая цитология печени: звездчатые клетки Ито / В. М. Цыркунов, В. П. Андреев, Р. И. Кравчук, И. А. Кондратович // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2016. – № 4 (56). – С. 90-99.
47. Клиническая цитология печени: клетки Купффера / В. М. Цыркунов, В. П. Андреев, Р. И. Кравчук, Н. И. Прокопчик // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2017. – Т. 15. - № 4. – С. 419-431.
48. К механизму активации восстановительных процессов в печени при использовании общей РНК клеток костного мозга / Н. А. Онищенко, Е. В. Фоменко, А. О. Никольская // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2020. Т. – 22. - № 3. – С. 134-142.
49. Колмакова, Т. С. Использование микроядерного теста для оценки эффективности лечения аллергии у детей : метод. рекомендации / Т.С. Колмакова, С. Н. Белик, Е. В. Моргуль // РостГМУ – Ростов н/Д, 2013. - 31 с.
50. Конопля, А. И. Иммунометаболические нарушения при экспериментальном остром токсическом поражении печени: коррекция ксеногенными и аллогенными гепатоцитами / А. И. Конопля, Е. С.

- Литвинова, Н. А. Быстрова [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2016. – Т. 18. - № 2. – С. 91-98.
51. Корсаков, И. Н. Сравнительный анализ терапевтической эффективности стромальных клеток, выделенных из различных источников / И. Н. Корсаков, И. И. Еремин, А. П. Петрикина [и др.] // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2018. – Т. 62. - № 4. – С. 104-110.
52. Кузнецов, С. В. Возрастные особенности соотношения регенерации и повреждения гепатоцитов крыс при стрессе и патогенетические аспекты их коррекции // Пермский медицинский журнал / С. В. Кузнецов – 2012. – Т. 29. – № 3.
53. Лабораторная диагностика цирроза печени / В. В. Базарный, Е. Н. Бессонова, Л. И. Савельев [и др.] // Екатеринбург, 2018.
54. Ланг, Т. А. Как описывать статистику в медицине / Т. А. Ланг, С. Сесик.- М.: Практическая медицина. - 2016. - 480с.
55. Лепехова, С. А. Влияние однократного введения экзогенного фактора роста гепатоцитов на показатели неспецифической резистентности в условиях пострезекционного повреждения печени / С. А. Лепехова, Л. В. Зарицкая, Е. В. Батунова [и др.] // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2016. – Т. 1. - № 1(107). – С. 49-55.
56. Лепехова, С. А. Влияние токсического повреждения печени на структурные изменения митохондрий и внутриклеточных органелл / С. А. Лепехова, О. А. Гольдберг, М. В. Прокопьев [и др.] // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2019. - № 3 (163). – С. 77-80.
57. Литвинова, Е. С. Взаимосвязь метаболических и иммунологических нарушений при экспериментальном остром тетрахлорметановом,

- ишемическом и алкогольном поражении печени / Е. С. Литвинова, А. И. Конопля, И. М. Холименко [и др.] // Биомедицинская химия. – 2020. – Т. 66. - № 5. – С. 392-400.
58. Литвинова, Е. С. Эффективность белков аллогенных гепатоцитов в коррекции иммунометаболических нарушений при остром ишемическом поражении печени / Е. С. Литвинова, А. И. Конопля, В. Т. Дудка // Курский научно-практический вестник Человек и его здоровье. – 2019. – № 1. – С. 103-113.
59. Лукашик, С. П. Мониторинг морфологических эффектов аутологичных мезенхимальных стволовых клеток, трансплантированных в печень при вирусном циррозе (клиническое наблюдение) / С. П. Лукашик, О. В. Аленикова, В. М. Циркунов [и др.] // Архив внутренней медицины. – 2018. – Т. 8. – № 2 (40). – С. 150-160.
60. Лукашик, С. П. Острая печеночная недостаточность у взрослых: этиология, клинические проявления, методы коррекции / С. П. Лукашик, И. А. Карпов // Архив внутренней медицины. – 2017. - № 3. – С. 171-180.
61. Лупатов, А. Ю. Сравнение профиля экспрессии поверхностных молекулярных маркеров на мезенхимальных стромальных клетках культур, полученных из эндометрия и пуповины человека / А. Ю. Лупатов, Р. Ю. Сарыглар, В. Д. Чупрынин [и др.] // Биомедицинская химия – 2017. - № 63(1). – С. 85-90.
62. Люндуп, А. В. Стволовые прогениторные клетки печени и костного мозга как регуляторы восстановительной регенерации поврежденной печени / А. В. Люндуп, Н. А. Онищенко, М. Ю. Шагидулин, М. Е. Крашенинников // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2010. – Том XII. - № 2. С. 100-107.

63. Макеев, О. Г. Перспективы использования трансдифференцированных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) для коррекции печеночной недостаточности / О. Г. Макеев, А. В. Коротков, О. А. Сатонкина // Гены и Клетки. – 2019. – Т. 14. – С. 142.
64. Максимова, А. Ю. Изменение тромбоцитарных параметров у пациентов с циррозом печени В сборнике: Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения / А. Ю. Максимова, В. В. Базарный, Е. Н. Бессонова // Материалы IV Международной научно-практической конференции молодых учёных и студентов, IV Форума медицинских и фармацевтических вузов России «За качественное образование», посвященные 100-летию со дня рождения ректора Свердловского государственного медицинского института, профессора Василия Николаевича Климова. - 2019. - С. 92-97.
65. Мещанинов, В. Н. Сезонная и возрастная зависимости референсных значений некоторых лабораторно-диагностических показателей в Свердловской области / В. Н. Мещанинов, С. В. Цвиренко, Л. И. Савельев // Клиническая лабораторная диагностика. — 2016. — Т.61, № 9. — С. 586.
66. Минина, М. Г. Морфология ишемических повреждений в нулевых биоптатах печени посмертных доноров / М. Г. Минина, Д. В. Воронов, И. М. Ильинский // Вестник трансплантологии и искусственных органов. — 2019. — Т. 21. — № 5. — С. 70
67. Морфологическая оценка эффективности применения белков культуральной жидкости аллогенных гепатоцитов при острой токсической гепатопатии / А. В. Харченко, М. С. Разумова, В. Т. Дудка, Е. С. Литвинова // Морфология. – 2018. – Т. 153. - № 3. – С. 291-291а.
68. Морфологические изменения печени при экспериментальном остром тетрахлорметановом поражении и их коррекция аллогенными

- гепатоцитами, их культуральной жидкостью и фармакологическими препаратами / А. В. Харченко, М. С. Разумова, Е. С. Литвинова, В. Т. Дудка // В книге: Морфологические науки – Фундаментальная основа практической медицины. – 2016. – С. 193-195.
69. Нефедов, Г. В. Трансплантация печени. История и перспективы / Г. В. Нефедов // Справочник врача общей практики. – 2019. - № 9. – С. 65-71.
70. Онищенко, Н. А. Синусоидальные клетки печени и клетки костного мозга как компоненты единой функциональной системы регуляции восстановительного морфогенеза в здоровой и поврежденной печени / Н. А. Онищенко // Гены и клетки. – 2011. – Т. 6. – № 2.
71. Осиков, М. В. Патологические аспекты моделирования острой печеночной недостаточности / М. В. Осиков, К. А. Макарова // Вестник ЮУрГУ. - № 6. – 2010.
72. Осипов, Б. Б. Трансплантация мезенхимальных стволовых клеток при циррозе печени в эксперименте / Б. Б. Осипов, А. Н. Лызиков, А. Г. Скуратов [и др.] // В сборнике: Современные технологии в хирургической практике, сборник материалов Республиканской научно-практической конференции. – 2017. – С. 154-157
73. Оценка показателей регенераторной активности у больных хроническим вирусным гепатитом (ХГ) при старении / Н. Б. Крохина, С. В. Сазонов, А. П. Ястребов, Н. А. Серов // Актуальные вопросы медицины и экологии: Сб. научн.тр. / Изд-во УГМА. – Екатеринбург. – 1999. – С. 53.
74. Оценка тромбоцитарных показателей в автоматизированном анализе кровли у пациентов с циррозом печени / А. Ю. Максимова, Н. В. Гаренских, Е. Н. Бессонова, В. В. Базарный // Вестник Уральской медицинской академической науки. - 2019. - Т. 16. - № 3. - С. 351-356.

75. Перспективы применения препаратов на основе мезенхимальных стволовых клеток в терапии посттрансплантационных осложнений, связанных с иммунной несовместимостью / В. В. Бурунова, М. П. Васильев, Н. В. Ярыгин, К. Н. Ярыгин // Курский научно-практический вестник "Человек и его здоровье". - 2017. - №1. - С. 81-87.
76. Плотников, Е. Ю. Сравнение поведения в культуре дифференцированных и мультипотентных клеток из старых и молодых организмов / Е. Ю. Плотников, Н. В. Андрианов, Д. Н. Силачев [и др.] // Гены и клетки. – 2019. – Т. 14. - № 51. – С. 41.
77. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 19.01.2017 № 14н «Об утверждении формы спецификации на биомедицинский клеточный продукт». [Order of Ministry of Health of the Russian Federation No. 14n of January 19, 2017 (In Russ.)]
78. Применение аллогенных гепатоцитов для коррекции метаболических нарушений при хронической алкогольной интоксикации / Е. С. Литвинова, А. В. Харченко, Н. А. Быстрова, А. В. Конопля // Курский научно-практический вестник Человек и его здоровье. – 2017. - № 4. – С. 88-94.
79. Пролиферация клеток печени реципиента и хоуминг трансплантированных звездчатых клеток печени при частичной гепатэктомии у крыс / А. К. Шафигуллина, Э. И. Заикина, Е. Е. Гаранина [и др.] // Морфология. – 2019. – Т. 155. - №. 2. – С. 324.
80. Разумова, М. С. Морфологические изменения печени при экспериментальной острой токсической гепатопатии и их фармакологическая коррекция / М. С. Разумова, Е. С. Литвинова, А. В. Харченко [и др.] // Морфология. – 2017. – Т. 151. - № 3. – С. 99.

81. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. 3-е изд. М.: Медиа Сфера. - 2006. - 70с.
82. Рудаков, В. С. Влияние трансплантации аллогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга на морфофункциональное состояние печени после обширной резекции в эксперименте / В. С. Рудаков, Р. В. Деев, К. К. Губарев [и др.] // Гены & Клетки. - 2018. - № 2. - С. 77-82.
83. Рудаков, В. С. Применение мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в лечении острой печеночной недостаточности после обширной резекции печени в эксперименте / В. С. Рудаков, С. Э. Восканян, И. И. Еремин [и др.] // Гены & Клетки. - 2016. - № 4. - С. 70-74.
84. Рудаков, В. С. 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. – 138-144.
85. Сазонов, С. В. Особенности развития клеточной регенерации в печени / С. В. Сазонов // Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения: Тез. докл. научн. конф. – Екатеринбург: Изд-во УГМА, 1995. – С. 241.
86. Сазонов, С. В. Особенности состояния пролиферативных процессов в условиях возрастной инволюции организма: Автореф. дисс...докт. мед. наук. – Челябинск. – 1999. – с. 33.
87. Сазонов, С. В. Роль тучных клеток в регуляции регенерации тканей в условиях возрастной инволюции / С. В. Сазонов, А.П. Ястребов // В сб.: Общая и клиническая патофизиология (Мат. юбилейных Пашутиных

- чтений. Клиническая медицина, реабилитация и патофизиология). – СПб.: Изд-во НПЦ Технограф. – 1999. – С. 113–120.
88. Семаш, К. О. Обзор хирургической техники выполнения лапароскопических донорских резекций фрагментов печени / К. О. Семаш, С. В. Готье // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2020. – Т. 22. - № 4. – С. 149-153.
89. Скуратов, А. Г. Клеточная терапия цирроза печени в эксперименте / А. Г. Скуратов, А. Н. Лызиков, Б. Б. Осипов // В сборнике: Хирургия Беларуси на современном этапе, материалы XVI съезда хирургов Республики Беларусь и Республиканской научно-практической конференции. – 2018. – С. 329-331.
90. Скуратов, А. Г. Матриксная металлопротеиназа-9 и тканевой ингибитор металлопротеиназы-1 при патологии печени / А. Г. Скуратов, А. Н. Лызиков, Е. В. Воропаев [и др.] // В сборнике: Актуальные проблемы медицины. Сборник научных статей Республиканской научно-практической конференции с международным участием. Гомельский государственный медицинский университет. – 2019. - С. 147-149.
91. Скуратов, А. Г. Морфометрические параметры регенерации печени при частичной гепатэктомии и трансплантации мезенхимальных стволовых клеток в эксперименте / А. Г. Скуратов, А. Н. Лызиков, Д. А. Зиновкин // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2016 – № 4 – С. 57–65.
92. Скуратов, А. Г. Оптические методы визуализации стволовых клеток в тканях реципиента / А. Г. Скуратов, А. Н. Лызиков, А. Н. Кондрачук [и др.] / В сборнике: Актуальные проблемы медицины, сборник научных статей Республиканской научно-практической конференции и 26-й итоговой научной сессии Гомельского государственного медицинского университета. – 2017. - С. 701-704.

93. Солопаев, Б. П. Регенерация нормальной и патологически измененной печени / Б. П. Солопаев // Горький: Волго-Вят. кн. изд-во. - 1980. - 239 с.
94. Сравнительная характеристика экспериментального моделирования токсического поражения печени у крыс и кроликов / А. Н. Лызилов, Б. Б. Осипов, А. А. Призенцов, А. А. Слепцова // В сборнике: Актуальные проблемы медицины. Сборник научных статей Республиканской научно-практической конференции с международным участием. – 2016. – С. 596-598.
95. Сравнительное исследование процесса хондрогенной дифференцировки мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из разных источников / Ю. Б. Басок, А. М. Григорьев, Л. А. Кирсанова [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2019. – Т.21. - № 1. – С. 101-112.
96. Сравнительный анализ эффективности стимуляции процессов регенерации печени клетками костного мозга и общей РНК этих клеток / З. З. Гоникова, А. О. Никольская Л. А. Кирсанова [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2019. – Т. 21. - № 1. - С. 113-121.
97. Трубицина, И. Е. Иммуномодулирующий эффект аллогенных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга крыс / И. Е. Трубицина, Н. А. Онищенко, А. В. Люндуп [и др.] // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2016. № 11 (135). – С. 59-63.
98. Туманишвили, Г. Д. О теории внутритканевой регуляции скорости размножения клеток / Г. Д. Туманишвили, Н. В. Козлов, Н.В. Саламатина // Журн. общей биол. – 1968. - № 6. – С. 711-718.
99. Уразметова, М. Д. Методы формирования острой печеночной недостаточности в эксперименте (обзор литературы и собственные

- исследования) / М. Д. Уразметова, Ф. А. Хаджибаев, А. Г. Мирзакулов [и др.] // Вестник экстренной медицины. – 2018. – Том 11. - № 4. – С. 66-72.
100. Уразметова, М. Д. Анализ показателей иммуногенеза при алло- и ксенотрансплантации эмбриональных гепатоцитов / М. Д. Уразметова, Ф. А. Хаджибаев, А. Г. Мирзакулов / Вестник экстренной медицины. – 2018. - № 11(2). – С. 57-63.
101. Фриденштейн А.Я. Гистогенетический анализ внескелетного остеогенеза: дис. ... док. биол. наук. Москва, 1960.
102. Функциональная активность гепатоцитов при острой токсической гепатопатии: коррекция ксеногенными и аллогенными гепатоцитами / М. С. Разумова, Е. С. Литвинова, А. И. Михайлова, О. Н. Кузмицкая // В сборнике: Университетская наука: взгляд в будущее. Материалы международной научно-практической конференции. – 2016. – С. 337-340.
103. Хавинсон, В.Х. Пептидная регуляция старения / В. Х. Хавинсон // СПб: Гуманистика.– 2008. – 32 с.
104. Цвиренко, С. В. Состояние регенераторных процессов тканей в условиях воздействия на организм экстремальных факторов: Дис...д– ра мед. наук. – Челябинск. – 1993. – 435 с.
105. Цвиренко, С. В. Изменение состояния регенераторных процессов и содержания гликозаминогликанов в ткани печени при экстремальных воздействиях на организм / С. В. Цвиренко, С. В. Сазонов, А. П. Ястребов // Радиационный фактор и здоровье человека на Урале: Сб. научн. трудов. – Екатеринбург: Изд-во УГМИ. – 1995. – С. 158–172.
106. Цыркунов В. М. Клиническая морфология печени: гепатоциты, эндомембранная система / В. М. Цыркунов, В. П. Андреев, Р. И. Кравчук // Гепатология и гастроэнтерология. – 2019. – Т. 3. - № 1. – С. 28-42.

107. Шагидулин, М. Ю. Влияние соотношения клеток печени и ММСК костного мозга в имплантируемых клеточно-инженерных конструкциях печени на эффективность восстановления функциональных и морфологических показателей при хронической печеночной недостаточности / М. Ю. Шагидулин, Н. А. Онищенко, М. Е. Крашенинников [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2019. – Т. 21. – № 1. – С. 122-134.
108. Шафигуллина, А. К. Пролиферация клеток печени реципиента и хоуминг трансплантированных звездчатых клеток печени при частичной гепатэктомии у крыс / А. К. Шафигуллина, Э. И. Заикина, Е. Е. Каранина [и др.] // Морфология. – 2019. – Т. 155. – № 2. – С. 324.
109. Шафигуллина, А. К. Сравнение различных методов выделения, мечения и трансплантации перисинусоидальных клеток печени крысы / Ф. К. Шафигуллина, А. А. Трондин, Г. Р. Бурганова [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2013- Т. 8. - № 3. – С. 147-151.
110. Шевченко, О. П. Роль трансформирующего фактора роста бета 1 при заболеваниях печени / О. П. Шевченко, Р. М. Курабекова, О. М. Цирульникова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2017. – 62 (3). – С. 161-164.
111. Шилина, М. А. Характеристика мезенхимных стромальных клеток хориона человека после введения клеток в культуру / М. А. Шилина, Д. Н. Силачев, К. В. Горюнов [и др.] // Цитология. – 2019. – Т. 61. – С. 971-977.
112. Щастный, А. Т. Проблемы и перспективы использования клеточной терапии в лечении патологии печени / А. Т. Щастный, С. А. Сушков, О. Д. Мяделец // Новости хирургии. – 2017. - № 25(2). – С. 183-193.
113. Юшков, Б. Г. Влияние полигексаметилгуанидин гидрохлорида (ПГМГ) и четыреххлористого углерода (CCl₄) на структурно-функциональные

- показатели печени крыс в процессе формирования острого токсического повреждения печени / Б. Г. Юшков // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2008. – № 6. – С. 114–118.
114. Юшков, Б. Г. Клетки иммунной системы в регуляции регенерации / Б. Г. Юшков // Бюллетень сибирской медицины. – 2017. - 16 (4): 94–105.
115. Юшков, Б. Г. Регуляция миграции стволовых клеток при частичной гепатэктомии у мышей: роль системы фагоцитирующих мононуклеаров / Б. Г. Юшков // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2008. 93 – № 6. – С. 83–85.
116. Ястребов, А. П. Возрастные особенности пролиферативных процессов и распределения гликозаминогликанов в ткани печени / А. П. Ястребов, С. В. Сазонов, О. А. Шишмарева // Геронтология и гериатрия: Мат. межобл. Научнпракт. конф / Под ред. проф. А. П. Ястребова, В. С. Мякотных. – Екатеринбург: Изд-во УрГМА, 1999. – С. 111–112.
117. Ястребов, А. П. Возрастные особенности состояния пролиферативных процессов в миелоидной ткани / А. П. Ястребов, С. В. Сазонов // В сб.: Вопросы экспериментальной физиологии. – Екатеринбург: Изд-во УрО РАН. – 1997. – С. 158–163.
118. Abumaree, M. H. Immunomodulatory Properties of Human Placental Mesenchymal Stem/Stromal Cells / M. H. Abumaree, F. M. Abomaray, M. A. Alshabibi // Placenta. - 2017. - Vol. 59. – P. 87-95.
119. Abrogation of age-induced microRNA-195 rejuvenates the senescent mesenchymal stem cells by reactivating telomerase / M. Okada, H. W. Kim, K. Matsu-ura [et al // Stem Cells. - 2016. - Vol. 34. - № 1. - P. 148–159.
120. Afshari, A. Different approaches for transformation of mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells / A. Afshari, S. Shamdani, G. Uzan // Stem Cell Res Ther. – 2020. – Vol. 11(1). – P. 54.

121. Age-related changes in bone marrow mesenchymal stromal cells: a potential impact on osteoporosis and osteoarthritis development / P. Ganguly, J. J. El-Jawhari, P. V. Giannoudis [at al.] // *Cell Transplantation*. - 2017. - Vol. 26. - № 9. - P. 1520–1529.
122. Ajan, M. Hepatic stellate cells retain the capacity to synthesize retinyl esters and to store neutral lipids in small lipid droplets in the absence of LRAT / M. Ajan, M. Molenaar, J. F. Brouwers // *Biochim Biophys Acta*. - 2017. - 1862(2):176–87.
123. Alfaifi, M. Mesenchymal stromal cell therapy for liver diseases / M. Alfaifi, Y. W. Eom, N. P. Newsome // *Journal of Hepatology*. – 2018. – Vol.68. – P. 1272-1285.
124. Almalki, S. G. Effects of matrix metalloproteinases on the fate of mesenchymal stem cells / S. G. Almalki, D. K. Agrawal // *Stem Cell Res. Ther.* - 2016. - Vol. 7. - №. 1. - P. 129.
125. Alvaro, D. Liver capsule: biliary tree stem cell subpopulations / D. Alvaro, E. Gaudio // *Hepatology*. - 2016.- Vol. 64. - № 2. - P. 644.
126. 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.
127. Anderson, J. D. Comprehensive proteomic analysis of mesenchymal stem cell exosomes reveals modulation of angiogenesis via nuclear factor- κ B signaling / J. D. Anderson, H. J. Johansson, C. S. Graham // *Stem Cells*. - 2016- Vol. 34. - № 3. - P. 601–613.
128. Andreeva, E. Interaction of Multipotent Mesenchymal Stromal and Immune Cells: Bidirectional Effects / E. Andreeva, P. Bobyleva, A. Gornostaeva // *Cytotherapy*. - 2017. - Vol. 19(10). – P. 1152-1166.

129. Antoniadou, E. Placental Stem Cells / E. Antoniadou, A. L. David // *Best Practice & Research: Clinical Obstetrics & Gynaecology*. – 2016. - Vol. 31. – P. 13-29.
130. Apostolou, K. G. Undifferentiated adipose tissue stem cell transplantation promotes hepatic regeneration, ameliorates histopathologic damage of the liver, and upregulates the expression of liver regeneration and liver-specific genes in a rat model of partial hepatectomy / K. G. Apostolou, I. G. Papanikolaou, C. Katselis // *Stem Cells International*. - 2018. Vol. 2018. - Article ID 1393607. - P. 18.
131. Attachment, growth, and detachment of human mesenchymal stem cells in a chemically defined medium / D. Salzig, J. Leber, K. Merkewitz [et al.] // *Stem Cells International*. - 2016. - Vol. 2016. - Article ID 5246584. – P. 10.
132. Baker, A. H. Glittering role for perivascular stem cells in blood vessel remodeling / A. H. Baker, B. A. Peault // *Cell Stem Cell*. - 2016. - Vol. 19. №. 5. - P. 563–565.
133. Bartneck, M. Isolation and time lapse microscopy of highly pure hepatic stellate cells / M. Bartneck, K. T. Warzecha, C. G. Tag // *Anal Cell Pathol (Amst)*. - 2015: 417023. doi:10.1155/2015/417023.
134. Beeravolu, N. Isolation and Characterization of Mesenchymal Stromal Cells From Human Umbilical Cord and Fetal Placenta / N. Beeravolu, Ch. McKee, A. Alamri // *The Journal of Visualized Experiments*. - 2017 - Vol. 122.
135. Billing, A. M. Comprehensive transcriptomic and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells reveals source specific cellular markers / A. M. Billing, S. S. Dib // *Sci Rep*. - 2016;6:21507.
136. Blanco, B., Immunomodulatory effects of bone marrow versus adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells on NK cells: implications in the transplantation setting / B. Blanco, M. C. Herrero-Sánchez, C. Rodríguez-

- Serrano // *European Journal of Haematology*. - 2016. - Vol. 97. № 6. - P. 528–537.
137. Bosch, J. The portal hypertension syndrome: etiology, classification, relevance, and animal models / J. Bosch, Y. Iwakiri // *Hepatology International*. - 2018. - Vol. 12. - Supplement 1. - P. 1–10.
138. Boyd, A. The role of stem cells in liver injury and repair / A. Boyd, Ph. Newsome, W. Lu // *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*. – 2019. – Vol. 13(7). – P. 623-531.
139. Brown, Ch. Mesenchymal Stem Cells: Cell Therapy and Regeneration Potential / Ch. Brown, Ch. McKee, Sh. Bakshi // *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. – 2019. - Vol. 13(9). – P. 1738-1755.
140. Camilleri, E. T. Identification and validation of multiple cell surface markers of clinical-grade adipose-derived mesenchymal stromal cells as novel release criteria for good manufacturing practice-compliant production / E. T. Camilleri, M. P. Gustafson, A. Dudakovic // *Stem Cell Res Ther*. - 2016;7:107.
141. 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.
142. Carpino, G., Neoplastic transformation of the peribiliary stem cell niche in cholangiocarcinoma arisen in primary sclerosing cholangitis / G. Carpino, V. Cardinale, T. Folseraas // *Hepatology*. - 2019. - Vol. 69. - № 2. - P. 622–638.
143. Casiraghi, F. Mesenchymal stromal cells for tolerance induction in organ transplantation / F. Casiraghi , N. Perico , G. Remuzzi // *Human Immunology*. – 2018. – Vol. 79(5). – P. 304-313.
144. Catal, T. An antioxidant combination improves histopathological alterations and biochemical parameters in D-galactosamine induced hepatotoxicity in rats / T. Catal, S. Tunali, S. Bolkent // *Eur J Biol*. – 2017. – Vol. 76(1). – P. 14-19.

145. Chamuleau, R. A. F. M. End-stage liver failure: filling the treatment gap at the intensive care unit / R. A. F. M. Chamuleau, R. Hoekstra // *Journal of Artificial Organs.* – 2019.
146. 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.
147. Comparison of the biological characteristics of mesenchymal stem cells derived from the human placenta and umbilical cord / M. Wu, R. Zhang, Q. Zou // *Sci. Rep.* – 2018. - 8, 50 14.
148. Conforti, A. Resistance to neoplastic transformation of ex-vivo expanded human mesenchymal stromal cells after exposure to supramaximal physical and chemical stress / A. Conforti, N. Starc, S. Biagini // *Oncotarget.* - 2016. - Vol. 7. - № 47. - P. 77416– 77429.
149. Cunha, B. Bioprocess integration for human mesenchymal stem cells: from up to downstream processing scale-up to cell proteome characterization / B. Cunha, T. Aguiar, S. B. Carvalho // *Journal of Biotechnology.* - 2017. - Vol. 248. P. 87–98.
150. Davies, J. E. Concise review: Wharton’s Jelly: The rich, but enigmatic, source of mesenchymal stromal cells / J. E. Davies, J. T. Walker, A. Keating // *Stem cells translational medicine/* - 2017. - 6. - P. 1620– 1630.
151. Different characteristics of mesenchymal stem cells isolated from different layers of full term placenta / Y. S. Choi, Y. B. Park, C. W. Ha [at al.] // *J. PLoS ONE.* - 2017. Vol. 12. - 0172642.
152. Dong, W, An efficient and simple co-culture method for isolating primary human hepatic cells: potential application for tumor microenvironment research / W. Dong, A. Lu, J. Zhao // *Oncol Rep.* – 2016. - 36(4). - P. 2126–2134.

153. Ductular reaction in liver diseases: pathological mechanisms and translational significances / K. Sato, M. Marzioni, F. Meng [at al.] // *Hepatology*. - 2019. - Vol. 69. - № 1. - P. 420–430.
154. Effects of mesenchymal stem cells and VEGF on liver regeneration following major resection / G. Adas, B. Koc, M. Adas [at al.] // *Langenbecks Arch Surg*. – 2016. - 401(5). P. 725-740. doi: 10.1007/s00423-016-1380-9.
155. Eirin, A. Comparative proteomic analysis of extracellular vesicles isolated from porcine adipose tissue derived mesenchymal stem/stromal cells / A. Eirin, X. Y. Zhu, A. S. Puranik // *Sci Rep*. - 2016; 6: 36120.
156. El Sayed, H. Effect of Carbon Tetrachloride (CCL₄) on Liver in Adult Albino Rats: Histological study / H. EL Sayed, A. EL Sayed, L. EL Sayed Morsy [et al.] // *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*. – 2019. – Vol. 76(6). – P. – 4254-4261.
157. Eltahir, H. M. Esomeprazole ameliorates CCl₄ induced liver fibrosis in rats via modulating oxidative stress, inflammatory, fibrogenic and apoptotic markers / H. M. Eltahir, M. H. Nazmy // *Biomedicine and pharmacotherapy*. - 2018. – Vol. 97. - P. 1356–1365.
158. Esteves, C.L., Isolation and characterization of equine native MSC populations / C. L. Esteves, T. A. Sheldrake, S. P. Mesquita // *Stem Cell Research and Therapy*. - 2017. - Vol. 8. - № 1. - P. 80.
159. Exosomes secreted by mesenchymal stem cells promote endothelial cell angiogenesis by transferring miR-125a / X. Liang, L. Zhang, S. Wang [at al.] // *Journal of Cell Science*. - 2016. - Vol. 129. - № 11. - P. 2182–2189.
160. Feng, L.Y. Clinical application of mesenchymal stem cells in treatment of acute-on-chronic liver failure and related research advances / L. Y. Feng , D. Z. Zhang // *Chinese Journal of Hepatology*. – 2017. - Vol. 25(9). – P. 651-654.

161. Flow-cytometric assessment of cellular poly(ADP-ribosylation) capacity in peripheral blood lymphocytes / A. Kunzmann, D. Lui, K. Annett [at al.] // *Immunity & Ageing*. – 2006. – 3:8 doi:10.1186/1742-4933-3-8.
162. Fluid shear stress modulation of hepatocyte-like cell function / H. Rashidi, S. Alhaque, D. Szkolnicka [at al] // *Archives of Toxicology*. – 2016. – Vol. 90. – № 7. – P. 1757–1761.
163. 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.
164. Forbes, S. Stem Cells and Hepatocyte Transplantation / S. Forbs, S. Strom // *A Textbook of Liver Disease*. – 2018. – P. 84–97.
165. Franzen, J. Epigenetic modifications upon senescence of mesenchymal stem cells / J. Franzen, W. Wagner, E. Fernandez-Rebollo // *Current Stem Cell Reports*. – 2016. – Vol. 2. – № 3. – P. 248–254.
166. Friedman, S. L. Isolated hepatic lipocytes and Kupffer cells from normal human liver: morphological and functional characteristics in primary culture / S. L. Friedman, D. C. Rockey, R. F. McGuire // *Hepatology*. – 1992. – 15(2). – P. 234–243.
167. Gazdic, M. Crosstalk Between Mesenchymal Stem Cells and T Regulatory Cells Is Crucially Important for the Attenuation of Acute Liver Injury / M. Gazdic, B. S. Markovic, A. Arsenijevic // *Liver transplantation*. – 2018. – 24(5). – P. 687-702.
168. 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.

169. Giebel, B. Clinical potential of mesenchymal stem/stromal cell-derived extracellular vesicles / B. Giebel, L. Kordelas, V. Borger // *Stem Cell Investigation*. - 2017. - Vol. 4. - № 10. - P. 84.
170. Gilgenkrantz, H. Understanding liver regeneration from mechanisms to regenerative medicine / H. Gilgenkrantz, A. C. de l'Hortet // *The American Journal of Pathology*. – 2018. - Vol. 188(6). - P. 1316-1327.
171. Gilsanz, C. Adiposederived mesenchymal stem cells slow disease progression of acute-on-chronic liver failure / C. Gilsanz, M. A. Fuentes, S. Julian // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. - 2017. - Vol. 91. - P. 776–787.
172. Giri, T.K. Current Status of Stem Cell Therapies in Tissue Repair and Regeneration / T. K. Giri, A. Alexander, M. Agrawal // *Current Stem Cell Research & Therapy*. – 2019. – Vol. 14(2). – P. 117-126.
173. Gong, M. Mesenchymal stem cells release exosomes that transfer miRNAs to endothelial cells and promote angiogenesis / M. Gong, B. Yu, J. Wang // *Oncotarget*. - 2017. - Vol. 8. - № 28. P. 45200–45212.
174. Gong, Z. Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease in aging / Z. Gong, E. Tas, S Yakar [at al.] // *Mol Cell Endocrinol*. – 2017. - 455. – P. 115–130.
175. Greenbaum, L. E. Clinical translation of liver regeneration therapies: a conceptual road map / L. E. Greenbaum, C. Ukomadu, J. S. Tchorz // *Biochemical Pharmacology*. – 2020.
176. Guo, Q. Liver metabolomics study reveals protective function of *Phyllanthus urinaria* against CCl₄-induced liver injury / Q. Guo // *Chinese journal of natural medicines*. - 2017. - 15 (7). – P. 525–533.
177. Gustot, T. Acute-on-chronic liver failure vs. traditional acute decompensation of cirrhosis / T. Gustot, R. Moreau // *Journal of Hepatology*. - 2018. - Vol. 69. - № 6. - P. 1384–1393.

178. Hardy, T. Epigenetics in liver disease: from biology to therapeutics / T. Hardy, D. A. Mann. // *Gut*. – 2016. - 65(11). - P. 1895–1905.
179. Hardy, W. R. Transcriptional networks in single perivascular cells sorted from human adipose tissue reveal a hierarchy of mesenchymal stem cells / W. R. Hardy, N. I. Moldovan, L. Moldovan // *Stem Cells*. - 2017. - Vol. 35. - № 5. - P. 1273–1289.
180. Heo, J.S. Comparison of Molecular Profiles of Human Mesenchymal Stem Cells Derived From Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, Placenta and Adipose Tissue / J. S. Heo, Y. Choi, H. S. Kim // *International Journal of Molecular Medicine*. – 2016. - Vol. 37(1). – P. 115-125.
181. Hepatic stellate cell nomenclature (letter) / M. Ahern, P. Hall, L. C. Halliday [et al.] // *Hepatology* - 1:193. - 1996.
182. Hepatic stellate cells contribute to progenitor cells and liver regeneration / C. Kordes, I. Sawitza, S. Gotze, D. Herebian // *Journal of Clinical Investigation*. - 2014. - Vol. 124. - № 12. - P. 5503–5515.
183. Hetherington, A.M. Differential lipotoxic effects of palmitate and oleate in activated human hepatic stellate cells and epithelial hepatoma cells / A. M. Hetherington, C. G. Sawyez, E. Zilberman // *Cell Physiol Biochem*. – 2016. - 39(4):1648–62.
184. Hu, C. Improvement of mesenchymal stromal cells and their derivatives for treating acute liver failure / C. Hu, L. Li // *Journal of Molecular Medicine*. – 2019. – Vol. 97. – P. 1065-1084.
185. 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.

186. Hu, C. The immunoregulation of mesenchymal stem cells plays a critical role in improving the prognosis of liver transplantation / C. Hu , L. Li // *Journal of Translational Medicine*. – 2019. – Vol. 17(1). - P. 412.
187. Huang, Q. An efficient protocol to generate placental chorionic plate-derived mesenchymal stem cells with superior proliferative and immunomodulatory properties / Q. Huang, Y. Yang, Ch. Luo // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2019. – Vol. 10(301). – P. 1-15.
188. Human Amniotic Membrane Mesenchymal Stem Cells inhibit Neutrophil Extracellular Traps through TSG-6 / F. S. Magaña-Guerrero, A. Domínguez-López; P. Martínez-Aboytes // *Sci. Rep.* – 2017. Vol. 7. - 12426.
189. Hunt, N. J. Hallmarks of Aging in the Liver / N. J. Hunta, S. W. Kanga, G. P. Lockwooda // *Computational and Structural Biotechnology Journal*. – 2019. – Vol. 17. – P. 1151-1161.
190. Huselstein, C. Mechanobiology of mesenchymal stem cells: Which interest for cell-based treatment? / C. Huselstein, R. Rahouadj, N. de Isla // *Bio-Medical Materials and Engineering*. - 2017. - Vol. 28(1). – P. 47-56.
191. Hypoxic conditioned medium from human adipose-derived stem cells promotes mouse liver regeneration through JAK/STAT3 signaling / S. C. Lee, H. J. Jeong, S. K. Lee, S. J. Kim // *Stem Cells Translational Medicine*. - 2016. - Vol. 5. - № 6. - P. 816–825.
192. Immunomodulation by mesenchymal stromal cells and their clinical applications / H.L.R. Rilo, J. Cagliani, D. Grande [et al.] // *Journal of stem cell & Regenerative Biology*. - 2017. - Vol. 3. - № 2. – P. 1–14.
193. Inoue, A. Regulation of matrix metalloproteinase-1 and alpha-smooth muscle actin expression by interleukin-1 alpha and tumour necrosis factor alpha in hepatic stellate cells / A. Inoue, K. Obayashi, Y. Sonoda // *Cytotechnology*. - 2017. - Vol. 69. № 3. - P. 461–468.

194. Intraportal infusion of bone marrow mononuclear or CD133 + cells in patients with decompensated cirrhosis: a double-blind randomized controlled trial / M. Mohamadnejad, M. Vosough, S. Moossavi [et al.] // *Stem Cells Transl Med.* – 2016. - 5. - P. 87-94.
195. Isolation and molecular characterization of amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells obtained from caesarean sections / L. S. Spitzhorn, M. S. Rahman, L. Schwindt [et al.] // *Stem Cells Int.* – 2017. - 1–15.
196. Ito, T. Kupfer's cells and fat storing cells in the capillary wall of human liver / T. Ito, Nemoto M. // *Okajimas Folia Anat Jpn.* - 1952; 24(4):243–58.
197. Itoh, T. Stem/progenitor cells in liver regeneration / T. Itoh // *Hepatology.* - 2016. - Vol. 64. - № 2. - P. 663–668.
198. Jackson, C.J. Cultured Epidermal Stem Cells in Regenerative Medicine / K. A. Tonseth, T. P. Utheim // *Stem Cell Res Ther.* - 2017; 8(1): 155.
199. Jiang, W. Human Umbilical Cord MSC-Derived Exosomes Suppress the Development of CCl4-Induced Liver Injury through Antioxidant Effect / W. Jiang, Y. Tan, M. Cai // *Hindawi.* – 2018. - P. 1-11.
200. Kegel, V. Protocol for isolation of primary human hepatocytes and corresponding major populations of non-parenchymal liver cells / V. Kegel, D. Deharde, E. Pfeiffer // *J Vis Exp.* - 2016;109:e53069.
201. Khan, R. Modern management of acute liver failure / R. Khan, S. Koppe // *Gastroenterology Clinics of North America.* - 2018. - Vol. 47. - № 2. - P. 313–326.
202. Kholodenko, I. V. Cellular mechanisms of liver regeneration and cell-based therapies of liver diseases / I. V. Kholodenko, K. N. Yarygin // *BioMed Research International.* – 2017. – P. 1-17.

203. Kholodenko, I. V. Mesenchymal stem cells in the adult human liver: hype or hope? / I. V. Kholodenko, L. K. Kurbatov, R. V. Kholodenko [et al.] // *Cells*. – 2019. – T. 8. - № 10.
204. Kim, D. Current Understanding of Stem Cell and Secretome Therapies in Liver Diseases / D. Kim, G. S. Cho, C. Han // *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. – 2017. - Vol. 14(6). – P. 653-665.
205. Knook, D. L. Fat-storing cells of the rat liver. Their isolation and purification /D. L. Knook, A. M. Seffelaar, A. M. de Leeuw // *Exp Cell Res*. – 1982. - 139(2): P. 468–471.
206. Kobolak, J. Mesenchymal Stem Cells: Identification, Phenotypic Characterization, Biological Properties and Potential for Regenerative Medicine Through Biomaterial Micro-Engineering of Their Niche / J. Kobolak, A. Dinnyes, A. Memic // *Methods in Cell Science*. - 2016. - Vol. 99. – P. 62-68.
207. Kuriakose, J. Terminalia bellirica (Gaertn.) Roxb. fruit mitigates CCl4 induced oxidative stress and hepatotoxicity in rats / J. Kuriakose // *Biomedicine and pharmacotherapy*. - 2017. - 93. - P. 327–333.
208. Kwon, A. Tissue-specific differentiation potency of mesenchymal stromal cells from perinatal tissues / A. Kwon, Y. Kim, M. Kim // *Sci Rep*. – 2016. - 6:23544.
209. Lagasse, E. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo / E. Lagasse, H. Connors, M. Al-Dhalimy // *Nature Medicine*. - 2000 - Vol. 6. - №. 11. - P. 1229–1234.
210. Lanzoni, G. The hepatic, biliary, and pancreatic network of stem/progenitor cell niches in humans: a new reference frame for disease and regeneration // Lanzoni, V. Cardinale, G. Carpino // *Hepatology (Baltimore, Md)*. - 2016. - № 64(1). – P. 277 - 286.

211. Laouar, A. Potential antioxidant properties and hepatoprotective effects of *Juniperus phoenicea* berries against CCl₄ induced hepatic damage in rats / A. Laouar // *Asian Pacific journal of tropical medicine*. - 2017. - 10 (3), 263–269.
212. Leuning, D. G. The Cytokine Secretion Profile of Mesenchymal Stromal Cells Is Determined by Surface Structure of the Microenvironment / D. G. Leuning, N.R. M. Beijer, N. A. du Fossé // *Scientific Reports*. - 2018. - Vol. 8(1).
213. Li, C. Comparison of hepatic transcriptome profiling between acute liver injury and acute liver failure induced by acetaminophen in mice / C. Li, Y. Ming, W. Hong // *Toxicology Letters*. – 2018. – Vol. 283. – P. 69-76.
214. Li, H. Immunomodulatory Functions of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Engineering / H. Li, S. Shen, H. Fu // *Stem Cells International*. – 2019. – P. 1-18.
215. Li, N. Immune cells in liver regeneration / N. Li, J. Hua // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8(2). – P. 3628-3639.
216. Li, T. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Protect Against SCA3 by Modulating the level of 70 kD Heat Shock Protein / T. Li, Y. Liu, L. Yu // *Cellular and molecular neurobiology*. – 2018. – Vol. 38. – P. 641-655.
217. Lim, R. Concise Review: Fetal membranes in regenerative medicine: new tricks from an old dog? / R. Lim // *Stem cells Transl. Med*. – 2017. – Vol. 6. – P. 1767–1776.
218. Ling, K. X. Stromal Derived Factor-1/CXCR4 Axis Involved in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Recruitment to Injured Liver / K. X. Ling, L. Peng, Z. J. Feng // *Stem Cells International*. – 2016. – P. 2-10.
219. Liu, J. Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells in chemical-induced liver injury: a high-dimensional analysis / J. Liu, B. Feng, Y. Xu // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2019. – Vol 10(262). – P. 1-13.

220. Liu, Y. Prostaglandin E2 secreted by mesenchymal stem cells protects against acute liver failure via enhancing hepatocyte proliferation // Y. Liu, H. Ren, J. Wang // *The FASEB Journal*. – 2019. – Vol. – 33. – P. 2514-2525.
221. *Liver Pathophysiology. Therapies and Antioxidants* / Academic press. – 2017. - P. 113-123
222. Lo Sicco, C. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles as mediators of anti-inflammatory effects: Endorsement of macrophage polarization / C. Lo Sicco, D. Reverberi, C. Balbi // *Stem cells translational medicine*. – 2017. – 6. - P. 1018–1028.
223. Lou, G. Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic strategy for liver diseases / G. Lou, Z. Chen, M. Zheng // *Experimental & Molecular Medicine*. – 2017. – Vol. 49. – P. 1-9.
224. Macholdová, K. Latest findings on the placenta from the point of view of immunology, tolerance and mesenchymal stem cells / K. Macholdová, E. Macháčková, V. Prošková // *Ceska Gynekol*. – 2019. - Vol. 84(2). – P. 154-160.
225. Maeso-Díaz, R. Effects of aging on liver microcirculatory function and sinusoidal phenotype / R. Maeso-Díaz, M. Ortega-Ribera, A. Fernández-Iglesias // *Aging Cell*. – 2018. – P. 1-14.
226. Maher, S. Z. The clinical spectrum and manifestations of acute liver failure / S. Z. Maher, I. R. Schreiber // *Clinics in Liver Disease*. - 2018. - Vol. 22. - № 2. - P. 361–374.
227. Mahmood, A. Stem cell transplant for advanced stage liver disorders: current scenario and future prospects / A. Mahmood, R. Seetharaman, P. Kshatriya // *Current Medicinal Chemistry*. – 2019. – Vol. 26. – P. 1-16.
228. Manufacturing of human umbilical cord mesenchymal stromal cells on microcarriers in a dynamic system for clinical use / F. Petry, J. R. Smith, J.

- Leber [at al.] // *Stem Cells International*. - 2016. - Vol. – 2016. - Article ID 4834616. - P 12.
229. Mao, Y. Cell type-specific extracellular matrix guided the differentiation of human mesenchymal stem cells in 3D polymeric scaffold / Y. Mao, T. Hoffman, A. Wu // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* – 2017. - Vol. 28. - № 7. - P. 100.
230. Marfy-Smith, S. J. Are mesenchymal stem cells so bloody great after all? / S. J. Marfy-Smith, C. E. Clarkin // *Stem cells translational medicine/* - 2017. -6. - P. 3–6.
231. Marquardt, L. M. Design of injectable materials to improve stem cell transplantation / L. M. Marquardt, S. C. Heilshorn // *Current Stem Cell Reports*. - 2016. - Vol. 2. - № 3. - P. 207–220.
232. Mawatari, S. Acute liver failure / S. Mawatari, Y. Harada, M. Iwai // *Diagnosis of Liver Disease*. - 2019. – P. 45-50.
233. Mbarki, S. Phytochemical study and protective effect of *Trigonella foenum graecum* (Fenugreek seeds) against carbon tetrachloride-induced toxicity in liver and kidney of male rat / S. Mbarki // *Biomedicine and pharmacotherapy*. - 2017. - 8. - P. 19–26.
234. Mederacke, I. High-yield and high-purity isolation of hepatic stellate cells from normal and fibrotic mouse livers / I. Mederacke, D. H. Dapito, S. Affo // *Nat Protoc* 10(2):305–315. doi:10.1038/nprot.2015.017.
235. Michalopoulos, G. K. Hepatostat: liver regeneration and normal liver tissue maintenance / G. K. Michalopoulos // *Hepatology*. - 2017. - Vol. 65. - P. 1384-1392.
236. Mierson D. Donor-derived hepatocytes in human hematopoietic cell transplant recipients: evidence of fusion / D. Mierson, R. K. Parkin // *Virchows Arch.* – 2019. – 474. P. 365–374.

237. Miguel, M. Mesenchymal Stem Cells for Liver Regeneration in Liver Failure: From Experimental Models to Clinical Trials / M. de Miguel, I. Prieto, A. Moratilla // *Stem Cells International*. – 2019. – P. 1-12.
238. Milestones in liver disease / R. G. Knodell, K. G. Ishak, W. C. Black, T. C. Chen // *Journal of Hepatology*. – 2003. – 38. – P. 382–386.
239. Mishra, A. Prognostic models in acute liver failure / A. Mishra, V. Rustgi // *Clinics in Liver Disease*. - 2018. - Vol. 22. - № 2. - P. 375–388.
240. Mizukami, A. Stirred tank bioreactor culture combined with serum-/xenogeneic-free culture medium enables an efficient expansion of umbilical cord-derived mesenchymal stem/stromal cells / A. Mizukami, A. Fernandes-Platzgummer, J. G. Carmelo // *Biotechnology Journal*. - 2016. – Vol. 11. - № 8. - P. 1048–1059.
241. Mohar, I. Isolation of non-parenchymal cells from the mouse liver. / I. Mohar, K. J. Brempele, S. A. Murray // *Methods Mol Biol*. – 2015. – 1325. – P. 3–17.
242. Molehina, O. R. White butterfly (*Clerodendrum volubile*) leaf extract protects against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats / O. R. Molehina // *Biomedicine and pharmacotherapy*. - 2017. - 1, 6.
243. Monsarrat, P. An innovative, comprehensive mapping and multiscale analysis of registered trials for stem cell-based regenerative medicine / P. Monsarrat, J. N. Vergnes, V. Planat-Benard // *Stem cells translational medicine*. – 2016. -№ 5. – P. 826– 835.
244. Morsiani, C. The peculiar aging of human liver: A geroscience perspective within transplant context / C. Morsiana, M. G. Bacalini, A. Santoro // *Ageing Research Reviews*. – 2019. – Vol. 51. – P. 24-34.
245. Naba, A. The extracellular matrix: tools and insights for the “omics” era / A. Naba, K. R. Clauser, H. Ding // *Matrix Biol*. – 2016. - Vol. 49. - P. 10.

246. Nahar, S. Cytokines in adipose-derived mesenchymal stem cells promote the healing of liver disease / S. Nahar, Y. Nakashima, C. Miyagi-Shiohira // *World Journal of Stem Cells*. – 2018. – Vol. 10(11). – P. 146-159.
247. Naji, A. Biological Functions of Mesenchymal Stem Cells and Clinical Implications / A. Naji, M. Eitoku, B. Favier // *Cellular and Molecular Life Sciences*. - 2019. - Vol. 76(17). – P. 3323-3348.
248. Nicolas, C.T. Cell therapy in chronic liver disease / C. T. Nicolas, Y. Wang, S. L. Nyberg // *Current Opinion in Gastroenterology*. - 2016. - Vol. 32. - №. 3. - P. 189–194.
249. Nishizuka, S. S. Liver Regeneration Supported by Muse Cells / S.S. Nishizuka, Y. Suzuki, H. Katagiri // *Muse cells*. – 2018. – P. 219-241.
250. Nitzsche, F. Concise Review: MSC Adhesion Cascade—Insights into Homing and Transendothelial Migration / F. Nitzsche, C. Muller, B. Lukomska // *Stem cells*. – 2017. – Vol. – 35. – P. 1446-1460.
251. Ocampo, A. In vivo amelioration of age-associated hallmarks by partial reprogramming / A. Ocampo, P. Reddy, P. Martinez-Redondo // *Cell*. 2016. - Vol. 167. - № 7. - P. 1719– 1733.
252. Ozawa, Yu. Evaluation of safety for hepatectomy in a novel mouse model with nonalcoholic-steatohepatitis / Yu. Ozawa, T. Tamura, Y. Owada // *World Journal of Gastroenterology*. – 2018. – Vol. 24(15). – P. 1622-1631.
253. Pachler, K. A Good Manufacturing Practice-grade standard protocol for exclusively human mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles / K. Pachler, T. Lener, D. Streif // *Cytherapy*. – 2017. - № 19. - P. - 458–472.
254. Papanikolaou, I. G. Mesenchymal Stem Cells Transplantation following Partial Hepatectomy: A New Concept to Promote Liver Regeneration—Systematic Review of the Literature Focused on Experimental Studies in Rodent Models / I.

- G. Papanikolaou, C. Katselis, K. Apostolou // *Stem Cells International*. – 2017. – P. 1-22. Article ID 7567958
255. Peffers, M. J. Age-related changes in mesenchymal stem cells identified using a multi-omics approach / M. J. Peffers, J. Collins, Y. Fang // *European Cell and Materials*. - 2016. - Vol. 31. - P. 136– 159.
256. Perivascular cells and NADPH oxidase inhibition partially restore hyperglycemia-induced alterations in hematopoietic stem cell and myeloid-derived suppressor cell populations in the bone marrow / J. Y. Kim, J. Y. Lee, K. S. Ha [et al.] // *Int J Stem Cells*/ - 2018. – 12. - P. 63-72.
257. Perugorria M.J., Cholangiocyte-to-hepatocyte differentiation: a context-dependent process and an opportunity for regenerative medicine / M. J. Perugorria, P. Olaizola, J. M. Banales // *Hepatology*. - 2019. - Vol. 69. - № 2Ю - P. 480–483.
258. Petrenko, Y. The therapeutic potential of three-dimensional multipotent mesenchymal stromal cell spheroids / Y. Petrenko, E. Sykova, S. Kubinova // *Stem Cell Research & Therapy*. - 2017. - Vol. 8. - № 1. - P. 94.
259. Pfeiffer, E. Featured article: isolation, characterization, and cultivation of human hepatocytes and non-parenchymal liver cells / E. Pfeiffer, V. Kegel, K. Zeilinger // *Exp Biol Med (Maywood)*. – 2015. - 240 (5). – P. 645–656.
260. Phinney, D. G. Concise review: MSC derived exosomes for cell-free therapy / D. G. Phinney, M. F. Pittenger // *Stem Cells*. - 2017. - Vol. 35. - № 4. - P. 851–858.
261. Pilat, N. Implication for bone marrow derived stem cells in hepatocyte regeneration after orthotopic liver transplantation / N. Pilat, L. Under, A. Berlakovich // *International Journal of Hepatology*. – 2013. - Article ID 310612. - P. 7. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/310612>.

262. Placenta-derived mesenchymal stem cells enhance human liver organoid maturation: translational implications for liver regeneration / V. Miceli¹, A. L. Nigro, M. Pampalone // *Cytotherapy* 22. – 2020. - S26-S186.
263. Polyploid Hepatocytes Facilitate Adaptation and Regeneration to Chronic Liver Injury / P. D. Wilkinson, F. Alencastro, E. R. Delgado // *The American journal of pathology*. – 2019. – Vol 189. - № 6. – P. 1241 – 1254.
264. Pre-clinical and clinical investigations of metabolic zonation in liver diseases: the potential of microphysiology systems / A. Soto-Gutierrez, A. Gough, L. A. Verneti [at al.] // *Experimental Biology and Medicine*. - 2017. -Vol. 242. – P. 16.
265. Preziosi, M. E. Update on the Mechanisms of Liver Regeneration / M. E. Preziosi, S. P. Monga // *Seminars in Liver Disease*. – 2017. – Vol. 37(2). – P. 141-151.
266. Proangiogenic features of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications / H. Tao, Z. Han, Z. C. Han, Z. Li // *Stem Cells International*. - 2016. - Vol. 2016. - Article ID 1314709. – P. 11.
267. Prockop, D. J. The exciting prospects of new therapies with mesenchymal stromal cells / D. J. Prockop // *Cytotherapy*. - 2017. - Vol. 19. - № 1. - P. 1–8.
268. Protocols for in vitro differentiation of human mesenchymal stem cells into osteogenic, chondrogenic and adipogenic lineages in *Mesenchymal Stem Cells* / M. C. Ciuffreda, G. Malpasso, P. Musarò [at al.] // *Methods in Molecular Biology*. - 2016. - Vol 1416. - P. 149– 158.
269. Qu, F. Maturation state and matrix microstructure regulate interstitial cell migration in dense connective tissues / F. Qu, Q. Li, X. Wang, // *Sci. Rep.* – 2018. - Vol. 8. - № 1. - P. 3295.

270. Ragelle, H. Comprehensive proteomic characterization of stem cell-derived extracellular matrices / H. Ragelle, A. Naba, B. L. Larson // *Biomaterials*. – 2017. - Vol. 128. - P. 147.
271. Reddy, S. S. From Child-Pugh to model for end-stage liver disease: deciding who needs a liver 8 Stem Cells International transplant / S. S. Reddy, J. M. Civan // *Medical Clinics of North America*. - 2016. - Vol. 100. - № 3. - P. 449–464.
272. Reiner, A.T. Concise review: Developing bestpractice models for the therapeutic use of extracellular vesicles / A. T. Reiner, K. W. Witwer, B.W.M. van Balkom // *Stem cells translational medicine*. - 2017;6:1730–1739.
273. Ridge, S.M. Mesenchymal stem cells: Key players in cancer progression / S. M. Ridge, F. J. Sullivan, S. A. Glynn // *Mol Cancer*. - 2017; 16:31.
274. Riis, S. Comparative analysis of media and supplements on initiation and expansion of adiposederived stem cells / S. Riis, F. M. Nielsen, C. P. Pennisi // *Stem cells translational medicine*. – 2016. - № 5. – P. 314–324.
275. Rubtsov, Y. Molecular Mechanisms of Immunomodulation Properties of Mesenchymal Stromal Cells: A New Insight into the Role of ICAM-1 / Yu. Rubtso, K. Goryunov, A. Romanov // *Hindawi*. – 2017. – P. 1-15.
276. Rylova, Yu. V. Characteristics of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells from Human Terminal Placenta / Yu.V. Rylova, N.V. Milovanova, M.N. Gordeeva // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. - 2017. - Vol. 159(2). – P. 253-257.
277. Sacchetti, B. No identical “mesenchymal stem cells” at different times and sites: human committed progenitors of distinct origin and differentiation potential are incorporated as adventitial cells in microvessels / B. Sacchetti, A. Funari, C. Remoli // *Stem Cell Reports*. - 2016. - Vol. 6. - № 6. - P. 897– 913.

278. Saito, Y. Mechanism of impairment on liver regeneration in elderly patients: role of hepatic stellate cell function / Y. Saito, Y. Morine, M. Shimada // *Hepatol Res.* 2017; 47(6): 505–13.
279. Sakai, Y. Phase I clinical study of liver regenerative therapy for cirrhosis by intrahepatic arterial infusion of freshly isolated autologous adipose tissue-derived stromal/stem (regenerative) cell / Y. Sakai, M. Takamura, A. Seki // *Regenerative Therapy.* - 2017. - Vol. 6. - P. 52–64.
280. Samsonraj, R. M. Concise review: multifaceted characterization of human mesenchymal stem cells for use in regenerative medicine / R. M. Samsonraj, M. Raghunath, V. Nurcombe // *Stem Cells Transl. Med.* – 2017. - Vol. 6. - № 12. - P. 2173-2185.
281. Santos, V.T.M. Characterization of human AB serum for mesenchymal stromal cell expansion / V.T.M. dos Santos, A. Mizukami, M. D. Orellana // *Transfusion Medicine and Hemotherapy.* - 2017. - Vol. 44. - № 1. - P. 11–21.
282. Senescence of mesenchymal stem cells (review) / Y. Li, Q. Wu, Y. Wang [et al.] // *J. International Journal of Molecular Medicine.* - 2017. - Vol. 39. - № 4. - P. 775–782.
283. Sharma, S. Epigenetic regulation of hematopoietic stem cells. / S. Sharma, G. Gurudutta // *Int J Stem Cells.* – 2016. - № 9. - P. 36-43.
284. Shi, X. MSC-triggered metabolomic alterations in liver-resident immune cells isolated from CCl₄-induced mouse ALI model / X. Shi, J. Liu, D. Chen // *Experimental Cell Research.* – 2019. – Vol. 383(2).
285. Shiota, G. Progress in stem cell-based therapy for liver disease / G. Shiota, N. Itaba // *Hepatology Research.* - 2017. - Vol. 47(2). P. 127-141.
286. Sottile, F. Mesenchymal stem cells generate distinct functional hybrids in vitro via cell fusion or entosis / F. Sottile, F. Aulicino, I. Theka // *Sci Rep.* - 2016; 6:36863.

287. Spare parts from discarded materials: fetal annexes in regenerative medicine / G. Gaggi, P. Izzicupo, A. Di Credico [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. 20. 1573; doi:10.3390/ijms20071573.
288. Squillaro, T. Clinical trials with mesenchymal stem cells: an update / T. Squillaro, G. Peluso, U. Galderisi // *Cell Transplantation*. - 2016. - Vol. 25. - № 5. - P. 829–848.
289. Stab, B.R. Mitochondrial functional changes characterization in young and senescent human adipose derived MSCs / B. R. Stab, L. Martinez, A. Grismaldo // *Frontiers in Aging Neuroscience*. - 2016. - Vol. 8. - P. 299.
290. Suk, K. T. Transplantation with autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells for alcoholic cirrhosis: Phase 2 trial / K. T. Suk, J. H. Yoon, M. Y. Kim // *Hepatology*. - 2016. - Vol. 64. - № 6. - P. 2185–2197.
291. Suto, E. G. Prospectively isolated mesenchymal stem/stromal cells are enriched in the CD73+ population and exhibit efficacy after transplantation / E. G. Suto, Y. Mabuchi, N. Suzuki // *Scientific Reports*. - 2017. Vol. 7. - № 1. - P. 4838.
292. Swiderska-Syn, M. Myofibroblastic cells function as progenitors to regenerate murine livers after partial hepatectomy / M. Swiderska-Syn, W. K. Syn, G. Xie // *Gut*. - 2014. - Vol. 63. - № 8. - P. 1333–1344.
293. Systematic microcarrier screening and agitated culture conditions improves human mesenchymal stem cell yield in bioreactors / Q. A. Rafiq, K. Coopman, A.W. Nienow, C. J. Hewitt // *Biotechnology Journal*. - 2016. - Vol. 11. - № 4. - P. 473–486.
294. Szkolnicka, D. Concise review: advances in generating hepatocytes from pluripotent stem cells for translational medicine / D. Szkolnicka, D. C. Hay // *Stem Cells*. - 2016. - Vol. 34. - № 6. - P. 1421–1426.

295. Tao, Y.C. Stem Cells Transplantation in the Treatment of Patients with Liver Failure / Y. C. Tao, M. L. Wang, E. Q. Chen // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2018. – Vol. 13(3). – P. 193-201.
296. Terminologia histologica. Международные термины по цитологии и гистологии человека с официальным списком русских эквивалентов [Текст] : [справочное пособие] / [Банин В. В. и др.] ; под ред. В. В. Банина, В. Л. Быкова ; Federative international committee on anatomical terminology (FICAT), Российская гистологическая номенклатурная комис., Российское мед. науч. о-во анатомов, гистологов и эмбриологов. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2009. - 272 с. : табл.; 29 см.; ISBN 978-5-9704-1443-9
297. The mesenchymal precursor cell marker antibody STRO-1 binds to cell surface heat shock cognate 70 / S. Fitter, S. Gronthos, S. S. Ooi, A.C.W. Zannettino // *Stem Cells*. - 2017. - Vol. 35. - № 4. - P. 940–951.
298. The role of autophagy for the regeneration of the aging liver /X. Fengming , H. Chuanfeng, T. Hans-Michael // *Interndtional Journal of molecular sciences*. – 2020. – 21. - 3606; doi:10.3390/ijms21103606
299. Tissue-specific differentiation potency of mesenchymal stromal cells from perinatal tissues / A. Kwon, Y. Kim, M. Kim [at al.] // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. – 6. - 23544.
300. Toward development of iMesenchymal stem cells for immunomodulatory therapy / S.F.H. de Witte, M. Franquesa, C. C. Baan, M. J. Hoogduijn // *Frontiers in Immunology*. - 2016. - Vol. 6. - P. 648.
301. Tozetti, P. A. Expansion strategies for human mesenchymal stromal cells culture under xeno-free conditions / P. A. Tozetti, S. R. Caruso, A. Mizukami // *Biotechnology Progress*. - 2017. - Vol. 33. - № 5. - P. 1358–1367.

302. Trohatou, O. Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Regenerative Medicine: Past, Present, and Future / O. Trohatou, M. G. Roubelakis // Cellular reprogramming. - 2017. - Vol. 19(4). – P. 217-225.
303. Tsai, A.C. Expansion of human mesenchymal stem cells in fibrous bed bioreactor / A. C. Tsai, Y. Liu, T. Ma // Biochemical Engineering Journal. - 2016. - Vol. 108. - P. 51–57.
304. Tsuchiya, A. Clinical trials using mesenchymal stem cells in liver diseases and inflammatory bowel diseases / A. Tsuchiya, Y. Kojima, S. Ikarashi // Inflammation and Regeneration. – 2017. – Vol. 37(16). – P. 1-15.
305. Ultrasound-guided percutaneous portal transplantation of peripheral blood monocytes in patients with liver cirrhosis / S. J. Yu, J. H. Yoon, W. Kim [at al.] // Korean J Intern Med. - 2017;32:261-268.
306. 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.
307. Valencia, J. Comparative analysis of the immunomodulatory capacities of human bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells from the same donor,” / J. Valencia, B. Blanco, R. Yáñez // Cytotherapy. - 2016. - Vol. 18. - № 10. - P. 1297–1311.
308. Van Haele, M. Human Liver Regeneration: An Etiology Dependent Process / M. Van Haele, J. Snoeck, T. Roskams // Molecular sciences. – 2019. – Vol. 20. – P. 1-16.
309. Wang, J. Stem Cell-Based Therapies for Liver Diseases: An Overview and Update / J. Wang, M. Sun, W. Liu // Tissue Engineering and Regenerative Medicine. – 2019. – Vol. 16(2). – P. 107-118.
310. Wang, K. Over expression of c-Met in bone marrow mesenchymal stem cells improves their effectiveness in homing and repair of acute liver failure / K.

- Wang , Y. Li , T. Zhu // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2017. – Vol. 8(162). – P. 1-10.
311. Wang, N. Mesenchymal stem cells derived extracellular vesicles, via miR-210, improve infarcted cardiac function by promotion of angiogenesis / N. Wang, C. Chen, D. Yang // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. - 2017. - Vol. 1863. - № 8. - P. 2085–2092.
312. Wang, Y. Progress in mesenchymal stem cell–based therapy for acute liver failure / Y. Wang, D. Wu, B. Chen // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2018. – Vol. 9(1). – P. 1-9.
313. Watanabe, Y. Mesenchymal stem cells and induced bone marrow-derived macrophages synergistically improve liver fibrosis in mice / Y. Watanabe, A. Tsuchiya, S. Seino // *Stem Cells Translational Medicine*. - 2019. - Vol. 8. - № 3. - P. 271–284.
314. WHO. World health statistics 2016: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. World Health Organization, Geneva. - 2016.
315. Wilhelm, A. CD248/endosialin critically regulates hepatic stellate cell proliferation during chronic liver injury via a PDGF-regulated mechanism. / A. Wilhelm, V. Aldridge, D. Haldar // *Gut*. - 2016; 65(7):1175–85.
316. Wu, D. Stem cell transplantation for the treatment of end-stage liver disease / D. Wu, E. Chen, H. Tang // *World Journal of Hepatology*. – 2018, - Vol. 10(12). – P. 907-910.
317. Wu, M.Y. Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury / M. Y. Wu, G. T. Yiang, W. T. Liao // *Cellular Physiology and Biochemistry*. -2018. - Vol. 46. - № 4. - P. - 1650–1667.
318. Xiong, Yi. Hepatic NF-kB-inducing kinase (NIK) suppresses mouse liver regeneration in acute and chronic liver diseases / Yi Xiong, A. Torsoni, Wu Feihua // *eLife*. - 2018. - Vol. 7. - P. 1-18.

319. Zhang, B. Focus on extracellular vesicles: Therapeutic potential of stem cell-derived extracellular vesicles / B. Zhang, R. W. Yeo, K. H. Tan // *Int J Mol Sci.* - 2016; 17:174.