

На правах рукописи

Маклакова Ирина Юрьевна

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

14.03.03 – Патологическая физиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Екатеринбург 2021

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор

Базарный Владимир Викторович

Официальные оппоненты:

Киясов Андрей Павлович – доктор медицинских наук, профессор, член-корр. АН РТ, директор института фундаментальной медицины и биологии федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Власова Татьяна Ивановна – доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры нормальной и патологической физиологии с курсом гигиены федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Гуляева Инна Леонидовна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой патологической физиологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация:

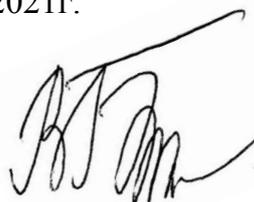
федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «1» июля 2021 г. в «__» часов на заседании совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 208.102.03, созданного на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 620028, г. Екатеринбург, Репина д. 3.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке им. В.Н. Климова ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, по адресу: 620028 г. Екатеринбург, ул. Ключевская, д. 17 и на сайте университета www.usma.ru, а также с авторефератом на сайте ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации: vak3.minobrnauki.gov.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2021г.

Учёный секретарь
диссертационного совета
д.м.н., профессор



В.В. Базарный

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

За последние несколько десятилетий клеточная терапия превратилась в потенциальный инструмент регенеративной медицины. Доклинические исследования с использованием клеточных технологий показали многообещающие результаты в отношении лечения широкого спектра заболеваний сердечно-сосудистой, дыхательной систем, опорно-двигательного аппарата (Александров В.Н., 2018; Giri T.K., 2018; Greenbaum L.E., 2020; Kim D., 2017; Monsarrat P., 2016; Готье С.В., 2020). В настоящее время исследователи продолжают развивать технологии клеточной терапии в клинических испытаниях (Lanzoni G., 2016; Marquardt L.M., 2016; Ragelle H., 2017). Однако, несмотря на имеющиеся достижения, все еще остаются нерешенными вопросы о том, какие типы клеток и тканевые источники наиболее эффективны 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 (Сазонов С.В., 2018; Ястребов А.П., 2015). 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 (Кузнецов С.В., 2012; Gong Z., 2017).

Как известно, патология печени занимает 5 место в структуре заболеваемости (Титова А.А., 2014; Реброва О. Ю., 2006; Asrani K., 2016; World health statistics 2016). В связи с этим представлялось важным изучить возможность активации регенерации печени, как при ее повреждении, так и в условиях возрастной инволюции. В этом направлении перспективным для коррекции морфофункционального состояния печени в процессе 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 (Samsonraj R.M., 2017). В последние годы накапливается экспериментальный материал, свидетельствующий о способности мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) вырабатывать противовоспалительные факторы, факторы роста, обеспечивающие повышение пролиферативной активности гепатоцитов (Gardic M., 2018; Itoh T., 2016; Kordes C., 2014; Macholdova K., 2019; Qu F., 2018). Доказана способность гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) посредством слияния с гепатоцитами (fusion-affect) активировать репаративную регенерацию печени (Буев Д.О., 2018; Mierson D., 2019). 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 (Гумерова А.А., 2011; Онищенко Н.А., 2011; Ajat M., 2017; Kordes C., 2014).

В последние годы получены сведения о способности перисинусоидальных клеток печени дифференцироваться в гепатоциты, холангиоциты (Гумерова А.А., 2016, Люндуп А.В., 2015; Шафигуллина А.К., 2016; Reiner A.T., 2017). Способность к самоподдержанию этих клеток позволила ряду авторов рассматривать перисинусоидальные клетки печени (ПКП) как претендента на роль стволовой клетки печени (Киясов А.П., 2015; Титова А.В., 2014; Шагидулин М.Ю., 2017). Имеются данные о выработке ММСК хемоаттрактанта для ГСК и ПКП (Brown Ch., 2019; Forbes S., 2018; Naji A., 2019). Способность ММСК оказывать иммуносупрессивное действие позволяет проводить аллогенную сочетанную трансплантацию ММСК с другими клетками (Abumaree M.N., 2017; Andreeva E., 2017; Blanco B., 2016; Rilo H.R.L., 2017). Учитывая биологические особенности взаимодействия ММСК с ГСК, а также с ПКП представляется перспективным изучение

влияния комбинаций этих клеток на морфофункциональное состояние печени в условиях ее повреждения, а также при старении.

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 (Кузнецов С.В., 2016; Giri Т.К., 2019; Hunt N.J., 2019; Maeso-Díaz R., 2018). При этом вопросы комбинированного применения различных видов стволовых клеток (ММСК+ГСК, ММСК+ПКП) остаются неисследованными.

Степень разработанности темы исследования

Значимый вклад в изучение влияния трансплантации стволовых клеток на восстановление морфофункционального состояния печени при ее повреждении внесли ряд отечественных и зарубежных ученых: Гумерова А.А., Киясов А.П., Титова А.А., Газизов И.М., Ельчанинов А.В., Скуратов А.Г., Люндуп А.В., Онищенко Н.А., Шагидуллин М.Ю., Крашенинников М.Е., Boyd A., Lagasse E., Pilat N., Giri Т.К., Forbes S., Kim D. При этом недостаточно уделяется внимания возможности проведения сочетанной трансплантации разных видов стволовых клеток для восстановления структуры поврежденной печени.

Представляется также необходимым изучить особенности регенерации печени под влиянием стволовых клеток в старом организме, так как при старении организма снижается способность клеток к направленному движению, к дифференцировке, выработке биологически активных веществ, снижается чувствительность клеток к факторам роста (Журавлева Л.В., 2015; Плотников Е.Ю., 2019; Hunt N.J., 2019). Это определяет отличия в развитии физиологической и репаративной регенерации печени при старении.

Все вышеперечисленное послужило основанием для выполнения настоящего диссертационного исследования.

Цель исследования: коррекция морфофункционального состояния печени зрелого и старого организма аллогенной трансплантацией разных комбинаций клеток: мультипотентных мезенхимальных стромальных, сочетанной трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных и гемопоэтических стволовых клеток, котрансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных и перисинусоидальных клеток печени.

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 клеток, 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.

Теоретическая и практическая значимость исследования

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 на фоне введения 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» Министерства здравоохранения Российской Федерации (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» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ректор – заслуженный деятель науки РФ, д.м.н., профессор Волчегорский И.А.), кафедры медицинской биохимии и биофизики федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина» (ректор – канд. истор. наук, доцент Кокшаров В.А.)

Методология и методы исследования

Проведен анализ современных отечественных и зарубежных данных, касающихся изменения морфофункционального состояния печени при ее повреждении под влиянием стволовых клеток. С целью изучения влияния стволовых клеток на репаративные процессы в печени было смоделировано ее повреждение двумя способами: проведение частичной гепатэктомии и введение четыреххлористого углерода. При работе с культурами клеток были использованы культуральный, иммуноцитохимический методы, метод проточной цитофлуориметрии. Для оценки морфофункционального состояния печени использовались морфологический, иммуногистохимический, биохимический методы, метод проточной цитофлуориметрии. Проводился статистический анализ полученных данных.

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 - преимущественно снижение запрограммированной гибели гепатоцитов.

Апробация работы

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на III Национальном конгрессе по регенеративной медицине (г. Москва 15-18 ноября 2017 г.), 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 (15-17 ноября 2018 г., г. Санкт-Петербург), 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 научных работ, в том числе 20 в журналах, рекомендованных ВАК РФ для опубликования основных научных результатов кандидатских и докторских диссертаций, из них 10 публикаций – в журналах, индексируемых в международной базе (Scopus), а также 4 патента на изобретение и 3 патента на промышленный образец.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, главы обзора литературы, описания материалов и методов, 3 глав собственных исследований, выводов и списка литературы, включающего 319 источника (117 отечественных, 202 иностранных). Диссертация содержит 257 страниц машинописного текста. Работа иллюстрирована 83 таблицами и 52 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Работа выполнена на кафедре патологической физиологии ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России.

Эксперименты проведены на 378 здоровых белых аутбредных мышьях-самцах возраста 6-8 месяцев, массой 26-28 г и 378 мышьях-самцах возраста 16-17 мес., массой 31–33 г. Эксперименты по получению культуры ПКП выполнены из печени 10 лабораторных животных возраста 6-8 месяцев, массой 25-27 г. Получение культуры ММСК и ГСК осуществлялось из хориона плаценты 30 мышьях-самок возраста 3–4 месяца, массой 20-25 г, срок гестации составлял 18 дней.

Были выделены опытная и контрольная группы мышьях. Опытным группам производилось введение в хвостовую вену ММСК в дозе 120 тыс. клеток/мышья, ГСК в дозе 10 тыс. клеток/мышья, ПКП в дозе 270 тыс. клеток/мышья. Клетки суспендированы в 0,2 мл 0,9% раствора NaCl. 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 мышьях. Производилась

оценка биохимических показателей сыворотки крови и морфометрических показателей печени на 1, 3, 7 сутки после введения клеток.

Выделение, культивирование, идентификация мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток

Выделение культуры ММСК осуществлялось согласно модифицированному методу Тепляшина А.С. с соавторами 2004 г. Культивирование клеток осуществляли в условиях CO₂ инкубатора при 37°C в увлажненной атмосфере с содержанием CO₂ 5 %. Смену питательной среды производили каждые 3-4 суток. Жизнеспособность выделенных клеток определялась с помощью 7-AAD (7-Aminoactinomycin D) на проточном цитофлуориметре Beckman Coulter Navios. Для анализа функциональных свойств выделенных ММСК оценивали направленную дифференцировку клеток в адипоцитарном и остеогенном направлениях.

Дифференцировку в адипоцитарном направлении и дальнейшую окраску на липиды проводили по модифицированному методу M. Reyes с соавторами. 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.

Дифференцировку ММСК в остеогенном направлении проводили по методу M. Reyes с соавторами, 2001г. с последующей постановкой реакции Ван Косса.

Иммунофенотипирование суспензии ММСК было проведено методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител, конъюгированных с флуорохромами (Becton Dickinson, США). Во фракции трансплантируемых клеток оценивалось содержание ММСК с иммунофенотипом положительных по CD105, CD29, Sca-1 и отрицательных по CD45 на проточном цитометре Beckman Coulter Navios с помощью набора Mouse Mesenchymal Stem Cell Multi-Color Flow Cytometry Kit (Bio-Techne,

США). ММСК с фенотипом CD45-, CD105+, Sca1+, CD29+ составили 93,5% (рисунок 1).

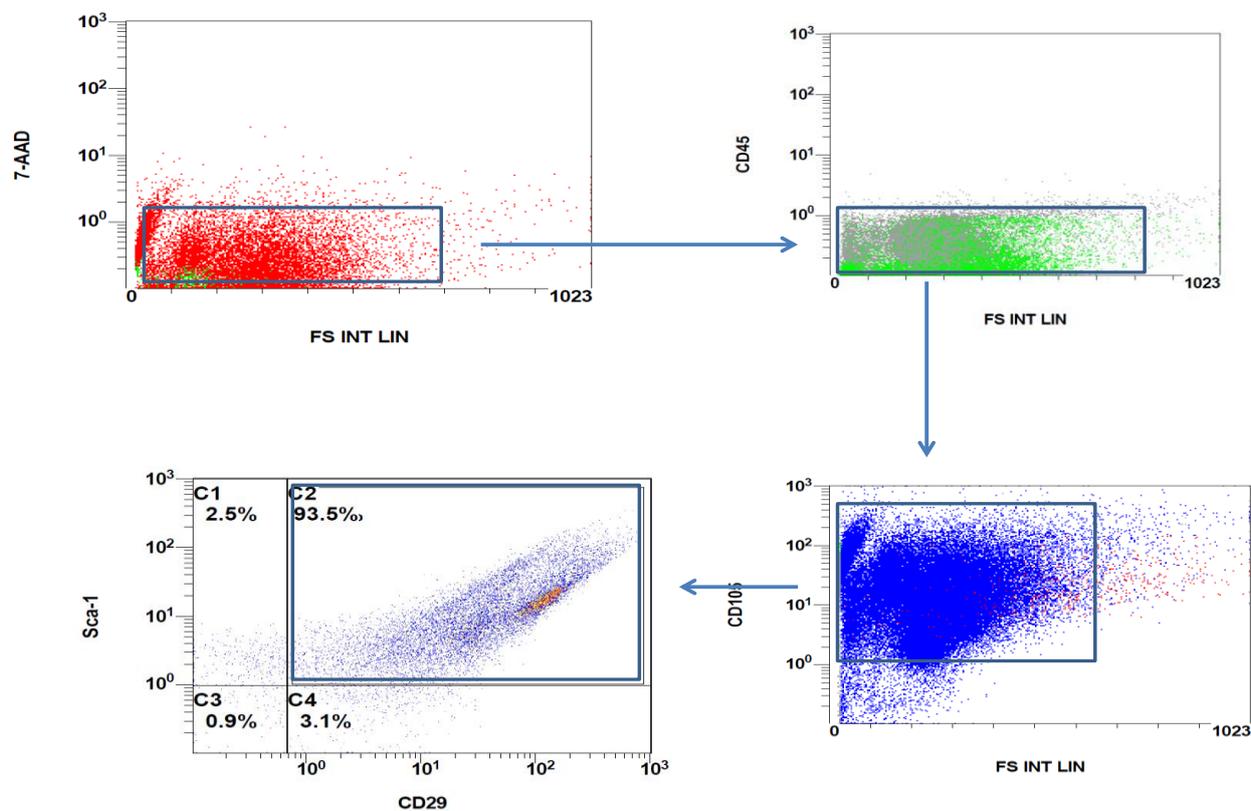


Рис. 1. Последовательность гейтирования для получения ММСК с фенотипом CD45-, CD105+, Sca1+, CD29+

Выделение гемопоэтических стволовых клеток

Выделение ГСК осуществлялось методом позитивной иммуномагнитной сепарации по антигенам Sca1, CD-117 с использованием набора Easy Sep Mouse SCA 1 Positive Selection Kit (StemCell Technologies, Канада). Содержание CD 117 +, Sca-1+, 7-AAD-, Lin- клеток после иммуномагнитной сепарации составило 95,6%.

Выделение, идентификация перисинусоидальных клеток печени

Выделение ПКП осуществлялось методом коллагеназно-пропазной перфузии в градиенте плотности гистоденза (Киясов А.П., 2016).

Непосредственно после выделения ПКП характеризовались положительной флуоресценцией на ретинол и отрицательной на α -SMA – маркер миофибробластов α -гладкомышечный актин (рисунки 2, 3).

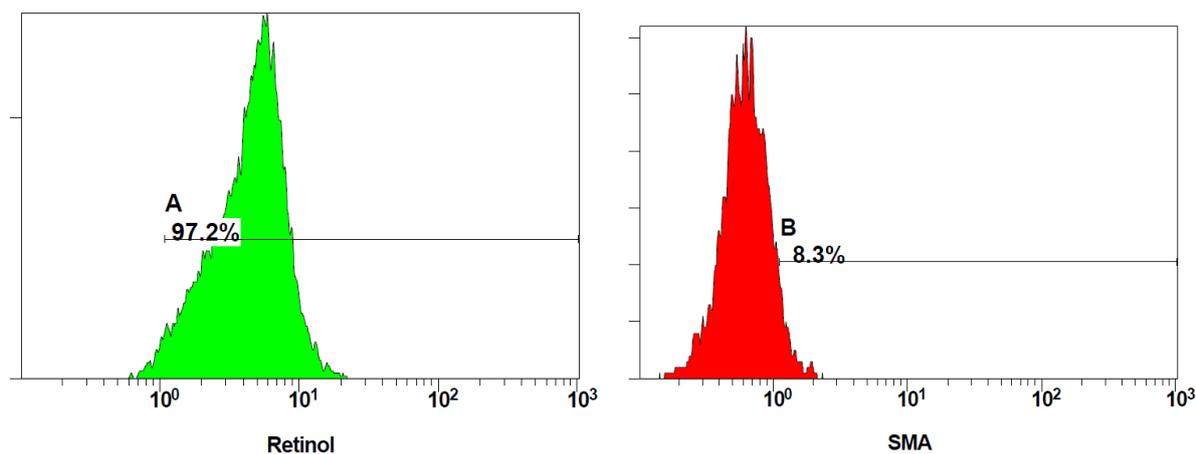


Рис. 2. Анализ ПКП на проточном цитофлуориметре до культивирования. Количество Retinol+клеток составляет 97,2%, количество SMA+ клеток составляет 8,3%.

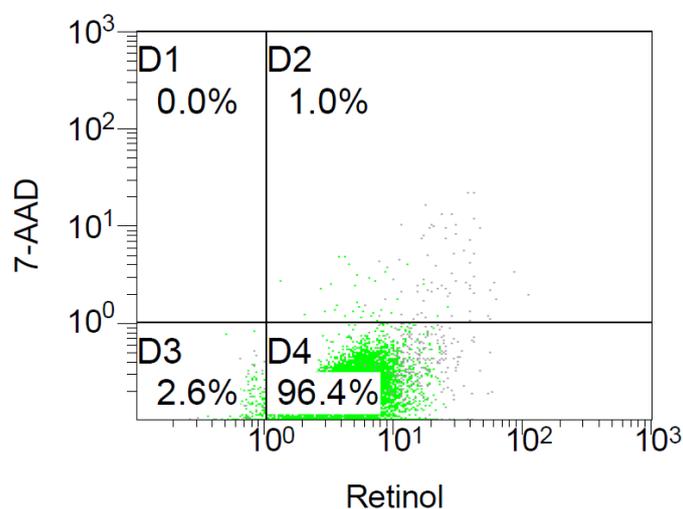


Рис. 3. Количество жизнеспособных клеток с положительной флуоресценцией на ретинол составило 96,4 %.

В процессе культивирования ПКП приобретают миофибробластоподобный фенотип. Поэтому после 14 дней культивирования флуоресценция на ретинол исчезала, клетки становились позитивными по α -SMA (рисунок 4).

При культивировании ПКП приобретают миофибробластоподобный фенотип, начинают экспрессировать α -ГМА, эпителиальные маркеры, характерные для гепатобластов.

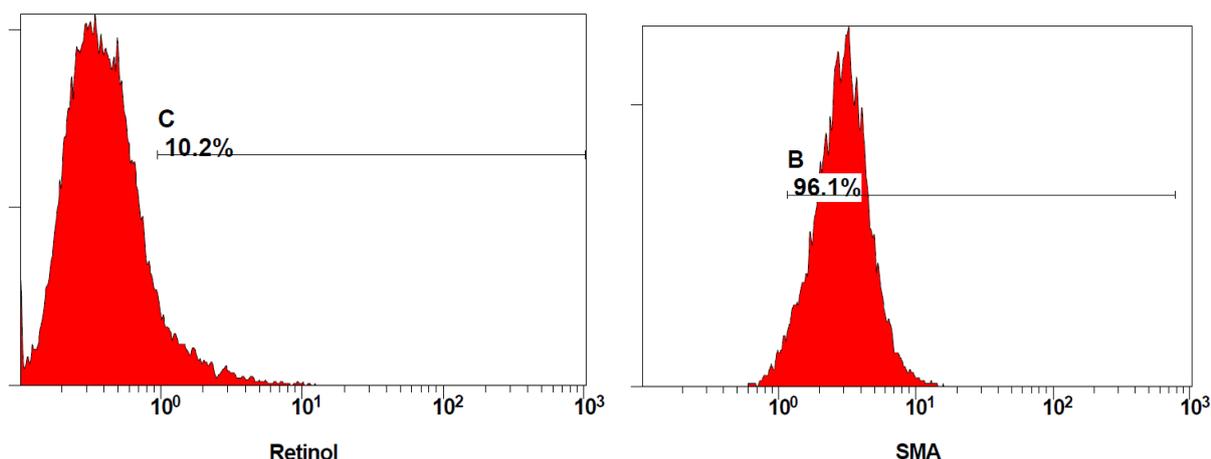


Рис 4. Анализ ПКП на проточном цитофлуориметре 14 дней культивирования. Количество Retinol+ клеток составило 10,2%, количество SMA+ клеток составляет 96,1%.

Моделирование патологии печени

Частичная гепатэктомия проводилась по методу С. Mitchell и Н. Willenbring, 2008 г. Острое токсическое повреждение печени моделировали путем однократного внутривентрального введения четыреххлористого углерода (CCl₄) в дозе 200 мкл/100 г (Уразметова М.Д., 2018).

Лабораторные методы исследования

Производилась оценка биохимических показателей сыворотки крови на автоматическом биохимическом и иммуноферментном анализаторе ChemWell 2910 (Combi, США) на 1, 3, 7 сутки после трансплантации клеток. Изучались следующие биохимические показатели: общий белок (биуретовая реакция), альбумин (колориметрический метод с бромкрезоловым зеленым), мочевины (уреазо-салицилат-гипохлоритный метод, реакция Бертлота), глюкоза (глюкозоксидазный метод), общий билирубин (Метод Йендрашека-Грофа), аспаратаминотрансфераза (АСТ) (L-аспарат: 2-оксоглутарат-амино-трансфераза, КФ 2.6.1.1.), аланинаминотрансфераза (АЛТ), (L-аланин: 2-оксоглутарат-амино-трансфераза, 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).

Морфологические методы исследования

Для изучения обзорной гистологической картины и морфометрического анализа во всех сериях экспериментов для исследования производилась аутопсия печени. Материал фиксировали в 10 % нейтральном формалине на 0,2 М фосфатном буфере (рН = 7,4) 24 часа, обезвоживали в этаноле возрастающей концентрации и заливали в парафин. Готовили срезы толщиной 5 мкм, которые окрашивали гематоксилином-эозином по Ван Гизону. 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 (индекс Кноделя).

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.

Для морфометрического анализа данных использовали компьютерные программы анализа изображений Biovision (Россия). С этой целью производили микрофотосъемку случайных полей зрения гистологических препаратов цифровой камерой OLYMPUS XC30 на базе микроскопа OLYMPUS BX51 (Япония) при увеличении $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$, $\times 600$, $\times 1000$ (не менее 10 полей зрения в каждом гистологическом срезе). Также производился расчет следующих морфометрических показателей:

1. Площадь гепатоцитов, мкм^2
2. Площадь ядер гепатоцитов, мкм^2
3. Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм^2
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 мм^2

6. Количество двуядерных клеток, кл/мм²

7. Митотический индекс (МИ) гепатоцитов, выраженный в промилле (‰). Митозы подсчитывали на гистологических срезах печени, окрашенных гематоксилином и эозином на 6000 клеток для каждого животного.

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

Уровень выраженности апоптоза гепатоцитов был определен путем подсчета апоптотического индекса (АИ) с использованием набора первичных и вторичных антител на гистологических срезах продольной ориентации по идентификации эффекторной каспазы-3 (Caspase-3) (Santa Cruz Biotech, USA).

Уровень запрограммированной гибели гепатоцитов был определен путем подсчета апоптотического индекса:

$$\text{АИ} = \frac{\text{Количество гепатоцитов в состоянии апоптоза}}{1000 \text{ подсчитанных гепатоцитов}} * 1000 \text{ ‰}$$

Постановка микроядерного теста осуществлялась по методу Belmont-Díaz J., López-Gordillo A.P., Garduño E.M., 2014 г.

Оценка уровня Поли-АДФ-рибозилирования осуществлялась методом проточной цитофлуориметрии (Kunzmann A. и соавт., 2018) в клетках печени с использованием первичных (Anti-Poly (ADP-Ribose) Polymerantibody, abcam, Великобритания) и вторичных антител (Rabbit Anti-Chicken IgY H&L (FITC) abcam, Великобритания)

Учитывая то, что интенсивность флуоресценции от каждой конкретной клетки зависит от количества меченых моноклональных антител, связавшихся со специфическими антигенами внутри клетки, то среднюю интенсивность флуоресценции популяции клеток (MFI), рассматривали как количественный критерий, характеризующий экспрессию антигенов (плотность рецепторов) внутри клетки (рисунок 5).

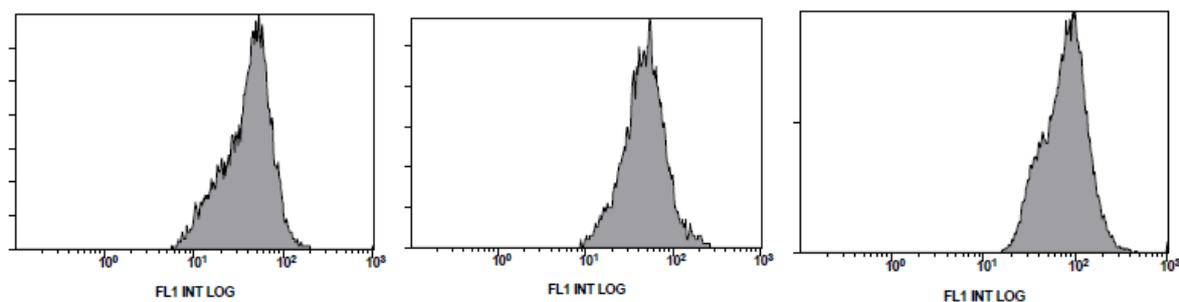


Рис 5. Уровень Поли (АДФ-рибоза)-полимера в клетках печени зрелых лабораторных животных в физиологических условиях - MFI = 45,2; на 7 сутки после резекции печени - MFI = 59,3; на 7 сутки после введения CCl₄ - MFI = 91,3.

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

Для оценки предтрансплантационной безопасности вводимых ММСК, ГСК и ПКП проводили анализ способности клеток образовывать колонии на агаре, а также измеряли оптическую плотность питательной среды. Исследование проводили с помощью набора Cell Transformation Detection Assay (Sigma-Aldrich, США). Было установлено отсутствие опухолевой трансформации в культуре трансплантированных клеток.

Методы статистической обработки полученных результатов

Статистическая обработка результатов исследования проводилась на основании принципов вариационной статистики. Для количественных исследований была проверена гипотеза о том, что выборки имеют различное распределение помощью критерия Колмогорова-Смирнова, поэтому использовались параметрические критерии при обработке показателей животных и непараметрические - при обработке данных, полученных при обследовании здоровых добровольцев и пациентов.

Статистическая обработка с использованием параметрических критериев включала определение средних величин (M) и стандартной ошибки среднего (SD). Достоверность различий (p) между средними значениями в группах оценивали согласно t-критерию Стьюдента для независимых выборок.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

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, внутрибрюшинно.

Для изучения хоуминга производилось мечение клеток с помощью флуоресцентных красителей. При этом ММСК окрашивались акридиновым оранжевым, ГСК и ПКП - CFDASE (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 (Ling K.X., 2016; Wang K., 2017). Трансплантируемые клетки: ММСК, ГСК,

ПКП имеют на своей мембране рецептор - CXCR4 к этому лиганду, что способствует их направленному движению в поврежденный орган, ткань (Шафигуллина А.К., 2019; Nitzsche F., 2017). 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) (Hardy W.R., 2017), интерлейкин-8 (IL-8), фактор роста гепатоцитов (HGF), матриксные металлопротеиназы (Qu F., 2018).

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 тирозинкиназа), экспрессирующимся в клетках печени (Лепехова С.А., 2016; Ельчанинов А.В., 2016). Активация данного рецептора вызывает повышение пролиферации гепатоцитов (Ельчанинов А.В., 2018; Скуратов А.Г., 2016). 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 (Li T., 2018; Fitter S., 2017). 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 двуядерных гепатоцитов. Это может быть результатом полиплоидизирующих митозов (Блинкова Н.Б., 2017; Бродский В.Я., 1981). 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 белкосинтетической 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 (IL-4, IL-10) (Anderson J.D., 2016; Brown Ch., 2019; Kobolak J., 2016). 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 (Sayed E.I., 2019; Eltahir H.M., 2018; Jiang W., 2018). При старении происходит увеличение соотношения ПОЛ/АОА в результате снижения антиоксидантной активности (Мещанинов В.Н., 2007). Это сопровождается накоплением свободных радикалов, образующихся в результате метаболизма четыреххлористого углерода, что приводит к более выраженной активности воспаления в печени у старых животных.

У зрелых и старых животных введение четыреххлористого углерода привело к уменьшению размеров гепатоцитов, что может быть связано с потерей гликогена гепатоцитами, а также с изменениями, происходящими в эндоплазматической сети, митохондриях, лизосомах (Guo Q., 2017). Наряду с этим по данным микроядерного теста увеличивается число патологических митозов.

После введения четыреххлористого углерода произошло увеличение количества двуядерных гепатоцитов, что можно объяснить тем, что в ранние сроки репаративной регенерации значительная часть митозов является ацитокинетическими (Аруин Л. И., 1987, Сазонов С.В., 2017). 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 белковосинтетической 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 (IL-4, IL-10) (Andreeva E., 2017; Brown Ch., 2019), 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 двуядерных 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) (Сазонов С.В., 1999), 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 (Крохина Н.Б, 2007; Ястребов А.П., 1999). 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 (Li T., 2018; Fitter S., 2017). 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 (Antoniadou E., 2016; Camilleri E.T., 2016).

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 с-KIT (CD 117) на поверхности перисинусоидальных клеток печени, способствует их пролиферации и дифференцировке в гепатоциты (Huselstein C., 2017; Konishi T., 2017). 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 (Wu M.Y., 2018). В литературе имеются данные, свидетельствующие о том, что ГСК способствуют пролиферации гепатоцитов и репарации печени после ее повреждения (Людуп А.В., 2010; Онищенко Н.А., 2011). Ряд исследователей утверждает о способности ГСК трансдифференцироваться в гепатоциты (Lagasse E., 2000; Sharma S., 2016). В последние годы доказана способность ГСК стимулировать морфофункциональное состояние печени путем слияния с гепатоцитами (fusion-effect) (Ocampo A., 2016). 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 6). У зрелых животных также произошло ограничение зон некроза гепатоцитов. Это может быть связано со способностью ГСК к синтезу TGF- β при стимуляции провоспалительными цитокинами (Скуратов А.Г., 2019). Введение четыреххлористого углерода сопровождается выраженной воспалительной реакцией в печени с выделением спектра провоспалительных цитокинов (Разумова М.С., 2017; Sayed E.I., 2019).

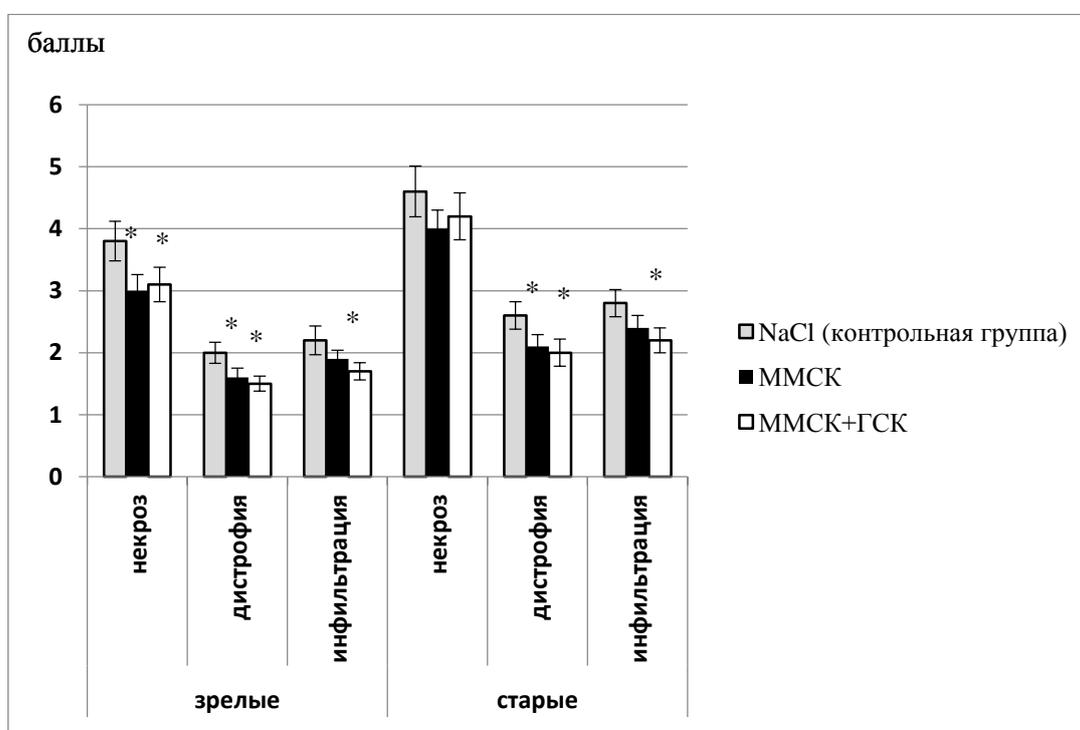


Рисунок 6. Показатели выраженности воспалительной реакции в печени зрелых и старых мышей на 7 сутки после введения клеток

Котрансплантация ММСК и ГСК вызывала повышение митотической активности гепатоцитов зрелых животных уже на 1 сутки, чего не наблюдалось при введении только ММСК (рисунок 7).

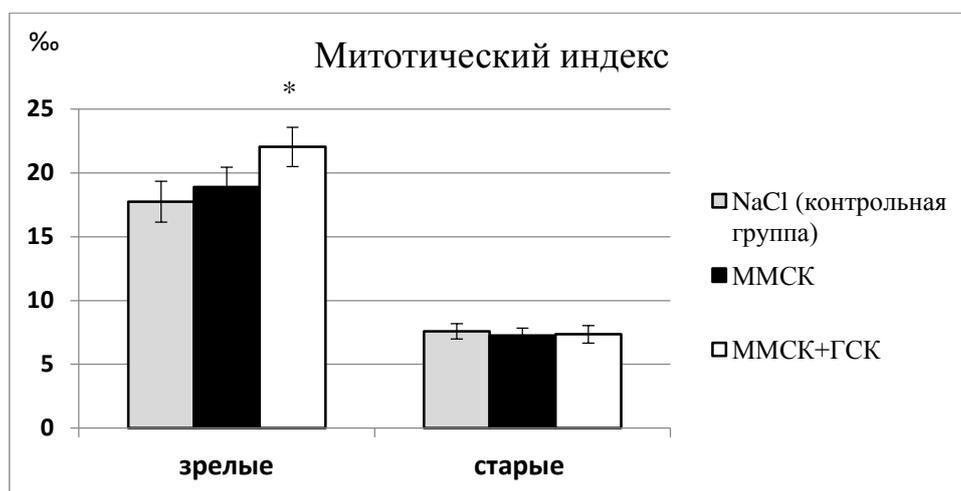


Рис 7. Изменение митотической активности гепатоцитов на 1 сутки после введения четыреххлористого углерода

Также котрансплантация MMCK и ГСК привела к увеличению количества двуядерных гепатоцитов в обеих возрастных группах. Выявленное повышение образования двуядерных гепатоцитов у зрелых и старых животных создает резерв полиплоидизации (Солопаев Б.П., 1980; Туманишвили Г.Д., 1968). В двуядерной клетке возрастает количество РНК и интенсифицируется белковый обмен. В наших опытах это нашло подтверждение при анализе биохимических показателей крови. У зрелых животных сочетанное введение MMCK и ГСК на фоне токсического повреждения печени привело к нормализации белковосинтетической функции печени – произошло восстановление содержания альбумина в крови. Напротив, у старых животных изменения показателей белкового обмена не обнаружены.

Проведение сочетанной трансплантации MMCK 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 MMCK (рисунок 8).

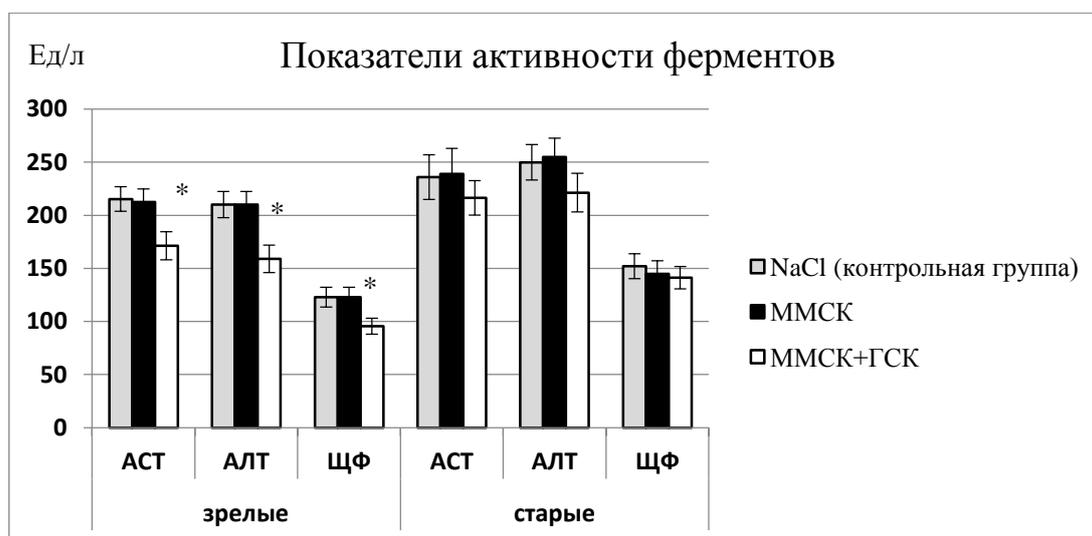


Рис 8. Показатели активности ферментов крови зрелых и старых животных на 1 сутки после резекции печени

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 (Гумерова А.А., 2011; Титова А.А., 2014). Эти клетки формируют микроокружение гепатоцитов, образуя

коллагены IV, VI, IVX типов, гликопротеины, протеогликаны (Онищенко Н.А., 2011; Inoue A., 2017). При патологии печени ПКП вырабатывают митогены для гепатоцитов – фактор роста гепатоцитов (HGF), фактор стволовых клеток (SCF), эпиморфин, плейотрофин (Hetherington A.M., 2016). Также известно, что и ММСК способны к выработке SCF, который способствует повышению пролиферативной активности ПКП (Gazdic M., 2017). 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 9) и повышение массы печени гепатоцитов зрелых животных (рисунок 10).

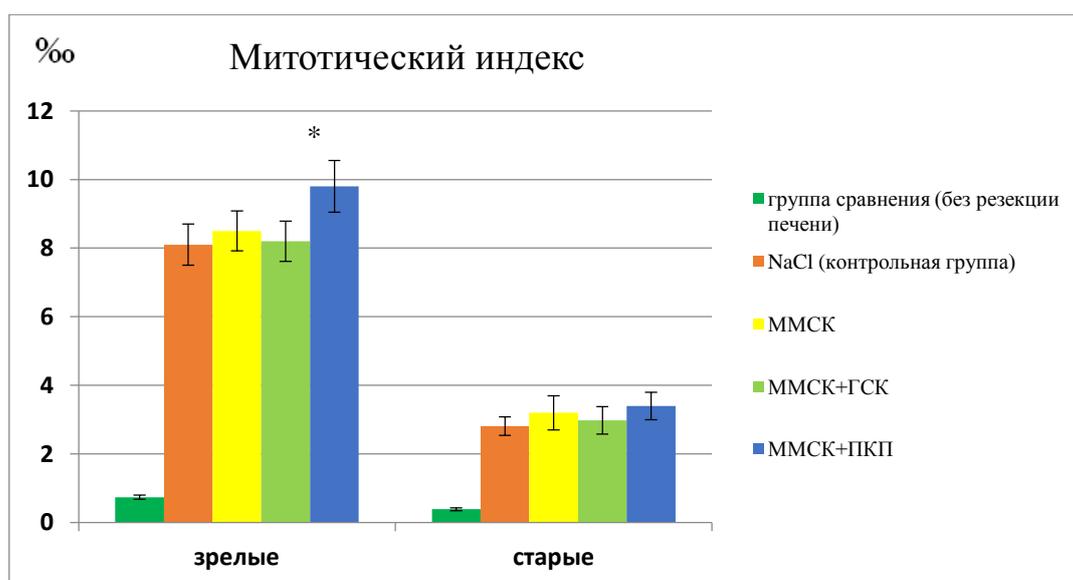


Рис. 9. Митотический индекс гепатоцитов на 3 сутки после частичной гепатэктомии

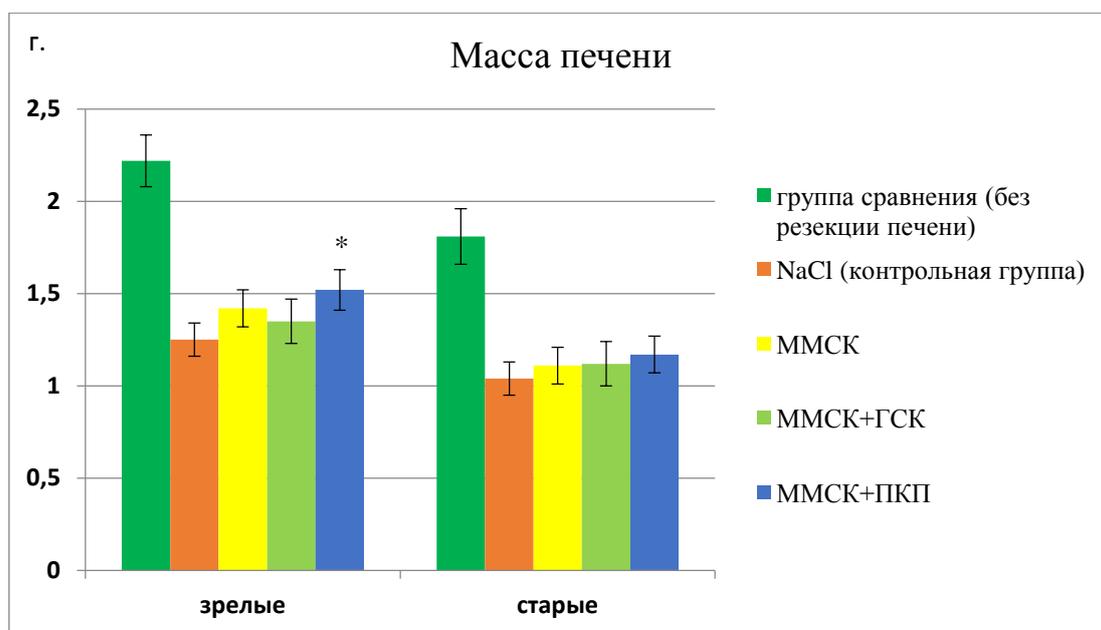


Рис. 10. Масса печени на 3 сутки после частичной гепатэктомии

Эти изменения могут быть связаны с обнаруженным в ходе исследования повышением уровня HGF в плазме крови (рисунок 11). 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.

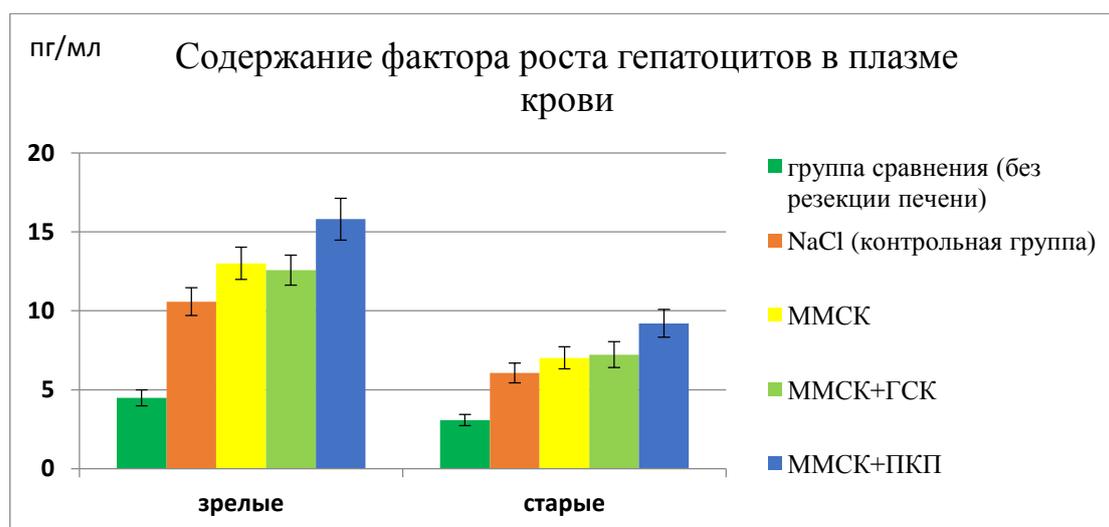


Рис. 11. Содержание HGF на 7 сутки после частичной гепатэктомии

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 12).

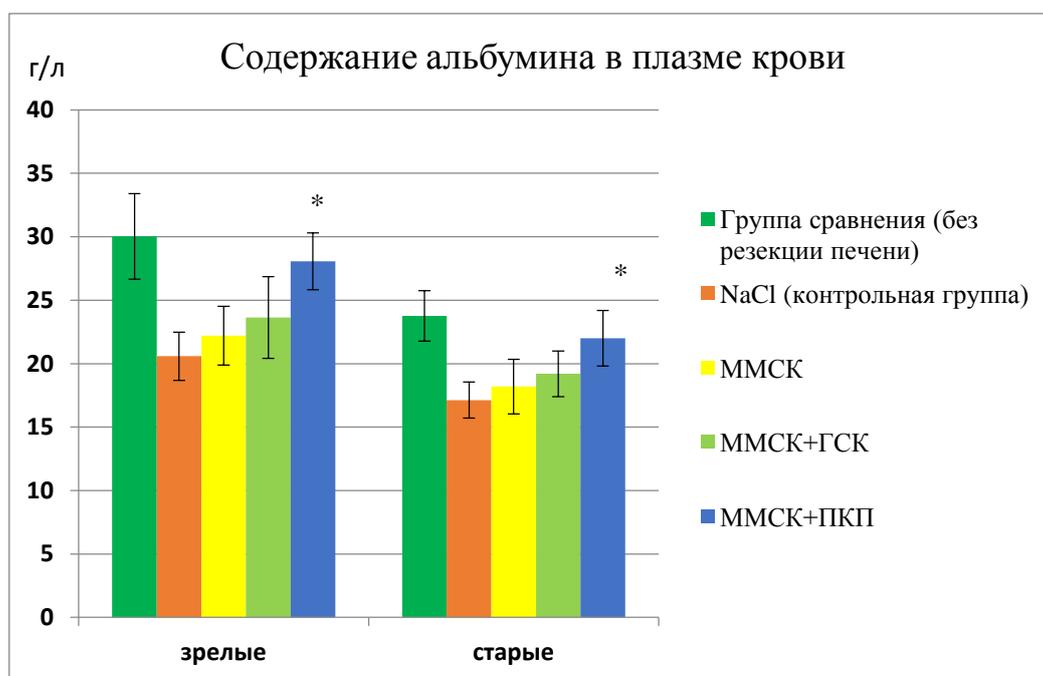


Рис 12. Содержание альбумина в плазме крови зрелых и старых животных на 7 сутки после резекции печени

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 (рисунок 18).

Заключение

Обобщая результаты, полученные в ходе выполнения экспериментального исследования, можно заключить, что для коррекции морфофункционального состояния печени после ее повреждения выбор трансплантируемых стволовых клеток, используемых для трансплантации, определяется видом повреждения печени. После частичной гепатэктомии целесообразно использовать сочетанную трансплантацию мультипотентных мезенхимальных стромальных и перисинусоидальных клеток печени. При токсическом повреждении печени более значимый эффект на восстановление структуры печени оказывает котрансплантация мультипотентных мезенхимальных стромальных и гемопоэтических стволовых клеток.

Одним из ключевых механизмов действия мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток является активация системы репарации ДНК, обеспечивающая снижение запрограммированной клеточной гибели, уменьшение уровня патологических митозов.

В настоящем исследовании выявлены возрастные особенности репаративной регенерации печени (рис. 13).



Рис. 13. Механизмы восстановления морфофункционального состояния печени при ее повреждении с помощью стволовых клеток с учетом возрастных изменений

Выводы

1. Использование MMCK, сочетанной трансплантации MMCK и ГСК, а также котрансплантации MMCK и ПКП сопровождается ускорением восстановления морфофункционального состояния печени в условиях ее частичной гепатэктомии и токсического повреждения.

2. Восстановление морфофункционального состояния печени после трансплантации MMCK, сочетанной трансплантации MMCK и ГСК, а также котрансплантации MMCK 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.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

I. Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, а также входящие в базу данных Scopus:

1. Гребнев, Д.Ю. Перспектива использования стволовых клеток для активации кроветворения в условиях возрастной инволюции на фоне воздействия ионизирующего излучения / Д. Ю. Гребнев, И. Ю. Маклакова, А. П. Ястребов // *Успехи Геронтологии*. – 2014. – Т. 27, № 2. – С. 348–352.

2. **Маклакова, И.Ю.** Влияние экстремальных факторов на хоуминг мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток / И.Ю. Маклакова, Д.Ю. Гребнев, А.П. Ястребов // **Патологическая физиология и экспериментальная терапия.** – 2015. - № 59 (4). – С. 82 – 86.
3. **Maklakova, I.Yu.** Changes in the Morphometric and Cytological Indices of the Spleen after Acute Blood Loss Followed by Stem Cell Injection / I.Yu. Maklakova, A.P. Yastrebov, D.Yu. Grebnev // **Advances in Gerontology.** – 2015. – Vol. 28. - № 2. – P. 218-221.
4. Ястребов, А.П. Об участии стволовых клеток в регуляции регенераторных механизмов при экстремальных повреждениях / А.П. Ястребов, **И.Ю. Маклакова**, Д. Ю. Гребнев [и др.] // **Вестник уральской медицинской академической науки.** – 2016. - № 1 (56). – С. 70-73.
5. **Маклакова, И.Ю.** Экспериментальные исследования влияния сочетанной трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и гемопоэтических стволовых клеток на регенерацию эпителия кишечника в условиях воздействия экстремальных факторов / И.Ю. Маклакова, Д.Ю. Гребнев, А.П. Ястребов // **Успехи геронтологии.** – 2016. – Т. 29. - № 3. – С. 433-436.
6. **Маклакова, И.Ю.** Влияние сочетанной трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных и гемопоэтических стволовых клеток на регенерацию гемопоэтической ткани / И.Ю. Маклакова, Д.Ю. Гребнев // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.** – 2017. – Т. 163. - № 1. – С. 73 – 77.
7. **Маклакова, И.Ю.** Активация регенерации красной и белой пульпы селезенки после проведения сочетанной трансплантации ММСК и ГСК в условиях воздействия ионизирующего излучения / И.Ю. Маклакова, Д.Ю. Гребнев, А.П. Ястребов // **Патологическая физиология и экспериментальная терапия.** – 2017. - № 61 (2). – С. 22 – 27.
8. Гребнев Д.Ю. Изменения морфометрических показателей селезенки в условиях воздействия ионизирующего излучения после трансплантации

- стволовых клеток / Д.Ю. Гребнев, **И.Ю. Маклакова**, А.В. Осипенко // **Вестник уральской медицинской академической науки.** – 2018. – Т.15. – № 1. – С. 55-59.
9. Влияние трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток на биохимические показатели крови после резекции печени у зрелых и старых лабораторных животных / И.Ю. Маклакова, Д.Ю. Гребнев, В.Ч. Юсупова [и др.]. // **Успехи геронтологии.** – 2018. – № 6. – Т. 31. – С. 933-936.
10. Изучение хоуминга ММСК после резекции печени / **И.Ю. Маклакова**, Д.Ю. Гребнев, В.Ч. Юсупова, Е.А. Примакова // **Патологическая физиология и экспериментальная терапия.** – 2019. – 63(1). – С. 40-45.
11. К вопросу о клеточной регуляции регенерации печени / В.В. Базарный, **И.Ю. Маклакова**, Д.Ю. Гребнев [и др.] // **Вестник уральской медицинской академической науки.** – 2019. – Vol. 16. – № 3. – С. 357-365.
12. Влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток на регенерацию печени в условиях её резекции / В.Ч. Юсупова, **И.Ю. Маклакова**, Д.Ю. Гребнев, И.В. Гаврилов // **Гены и клетки.** – 2019. – Т. 14. – №3. – С. 122-123.
13. **Маклакова, И.Ю.** Изменение биохимических показателей крови и морфометрических показателей печени в условиях токсического гепатита на фоне стволовых клеток / И.Ю. Маклакова, Д.Ю. Гребнев, В.Ч. Юсупова // **Гены и клетки.** – 2019. – Т. 14. – № 3. – С. 107
14. Хоуминг мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток при разных путях введения у старых лабораторных животных после резекции печени / **И.Ю. Маклакова**, Д.Ю. Гребнев, В.Ч. Юсупова, В.Я. Крохалев // **Успехи геронтологии.** – 2019. – Т. 32. – № 3. – С. 370-375.
15. Изучение влияния сочетанной аллогенной трансплантации плацентарных мультипотентных мезенхимальных стромальных и гемопоэтических стволовых клеток на регенерацию печени после ее резекции / В.В. Базарный, **И.Ю. Маклакова**, Д.Ю. Гребнев [и др.] // **Вестник уральской**

медицинской академической науки. – 2020. - Т. 17. - №1. - С. 80–88, DOI: 10.22138/2500-0918-2020-17-1-80-88

16. Оценка морфофункциональных изменений печени после ее резекции на фоне введения мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в условиях старения организма / В.Ч. Вахрушева, **И.Ю. Маклакова**, Д.Ю. Гребнев [и др.] // **Вестник уральской медицинской академической науки.** – 2020. – Т. 17. - № 1. - С. 89–97, DOI: 10.22138/2500-0918-2020-17-1-89-97
17. **Маклакова, И.Ю.** Влияние сочетанной трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и гемопоэтических стволовых клеток на регенерацию печени после ее резекции у старых лабораторных животных / И.Ю. Маклакова, В.В. Базарный, Д.Ю. Гребнев // **Вестник уральской медицинской академической науки.** – 2020. - Том 17. - № 2. - С. 139–148.
18. **Маклакова, И.Ю.** Коррекция морфофункционального состояния печени при остром гепатите с помощью стволовых клеток / И.Ю. Маклакова, Д.Ю. Гребнев // **Патологическая физиология и экспериментальная терапия.** - 2020. - 64(2). - С. 46-53.
19. **Маклакова, И.Ю.** Влияние ММСК и ГСК на репаративную регенерацию печени в условиях ее токсического повреждения / И.Ю. Маклакова, В.В. Базарный, Д.Ю. Гребнев // **Вестник уральской медицинской академической науки.** – 2020. - Том 17. - №3. - С. 243–248.
20. Морфофункциональные показатели печени после трансплантации ММСК животным с токсическим повреждением печени / **И.Ю. Маклакова**, В.В. Базарный, Д.Ю. Гребнев, В.Ч. Вахрушева // **Вестник уральской медицинской академической науки.** - 2020. - Том 17. - № 4. - С. 340–346.

II. Публикации в других рецензируемых журналах:

1. Влияние трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток на морфометрические показатели печени зрелых и старых лабораторных животных в условиях токсического гепатита / **И.Ю. Маклакова**, Д.Ю. Гребнев В.Ч. Юсупова, Е.М. Петрунина // **Морфология**. – 2020. – Т. 157. - №1. – С. 55-60.
 2. Pathogenetic substantiation of the combined transplantation use of multipotent mesenchymal stromal cells and hepatic stellate cells to restore the liver morphofunctional state after acute toxic hepatitis in the old body / **I. Maklakova**, D. Grebnev, V. Vakhrusheva, I. Gavrilov // BIO Web of Conferences 22, 01009 (2020) Longevity Interventions 2020.
 3. Possibility of using combined transplantation of multipotent mesenchymal stromal cells and hepatic stellate cells to activate reparative liver regeneration in mature and old organism / **I. Maklakova**, D. Grebnev, V. Vakhrusheva, E. Petrunina // BIO Web of Conferences 22, 01009 (2020) Longevity Interventions 2020.
- III. Работы, опубликованные в сборниках конференций регионального и международного уровней - 12 публикаций.
- IV. Патенты:
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 G09В 23/28 А61К 35/50 А61Р 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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ:

- АИ – апоптотический индекс
- АСТ – аспартатаминотрансфераза
- АЛТ - аланинаминотрансфераза
- ГСК – гемопоэтическая стволовая клетка
- ПКП – перисинусоидальная клетка печени
- IL – интерлейкин
- МИ - митотического индекс
- ММСК – мультипотентная мезенхимальная стромальная клетка
- МЯТ – микроядерный тест
- ПГ – простагландин
- ЩФ – щелочная фосфатаза
- CXCR4 – хемокиновый рецептор - 4 тип.
- HGF – фактор роста гепатоцитов
- HSP – белок теплового шока
- IFN – γ – гамма интерферон
- NCAM – нейрональные молекулы клеточной адгезии
- PARP – Поли(АДФ-рибоза)полимер
- 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

Маклакова Ирина Юрьевна

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

14.03.03 - Патологическая физиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Автореферат напечатан
по решению диссертационного совета Д 208.102.03
ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России от «31» марта 2021 г.