

**ВАХРУШЕВА**

**Виктория Чаукатовна**

**Патофизиологическое обоснование использования плацентарных  
мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток при повреждении  
печени в зрелом и старом организме**

**14.03.03-Патологическая физиология**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук**

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

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, доцент

**ГРЕБНЕВ Дмитрий Юрьевич**

**Официальные оппоненты:**

**КИЯСОВ Андрей Павлович** - доктор медицинских наук, профессор, член – корр. АН РТ, директор института фундаментальной медицины и биологии, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

**ВЛАСОВА Татьяна Ивановна** - доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры нормальной и патологической физиологии с курсом гигиены, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарёва»

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

Защита состоится « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2020 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, ул. Репина, д. 3.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке имени В.Н. Климова ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России по адресу: 620028, г. Екатеринбург, ул. Ключевская, д. 17 и на сайте университета <http://www.usma.ru>, а с авторефератом на сайте ВАК Министерства образования и науки РФ: [vak.minobrnauki.gov.ru](http://vak.minobrnauki.gov.ru).

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2020г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор медицинских наук, профессор

**БАЗАРНЫЙ**  
**Владимир Викторович**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Клеточная терапия в настоящее время является одной из самых перспективных и быстро развивающихся областей медицины. Биомедицинские клеточные продукты успешно применяются при лечении широкого спектра заболеваний, когда традиционные хирургические и терапевтические методы неэффективны.

Печень – уникальный орган, обладающий исключительной регенеративной способностью (Ястребов А.П. и др., 2007; Цвиренко С.В. и др., 2018; Michalopoulos G., 2017). В то же время при острых фульминантных формах и хронических заболеваниях печени репаративная способность гепатоцитов значительно снижается. Ежегодно в гепатологических центрах России наблюдается около 50 тыс. человек, страдающих токсическим гепатитом. В 2018 году количество пациентов с токсическим гепатитом увеличилось на 2,3% по сравнению с 2017 годом (Суринов А.Е. и др., 2018). Возрастающая печеночно-клеточная недостаточность является показанием для трансплантации печени пациенту. Однако, лишь небольшой части пациентов осуществляется трансплантация, из-за дефицита донорских органов. При этом, любое оперативное вмешательство имеет свои риски, такие как: опасность отторжения трансплантата, инфекционные осложнения, рецидивы заболеваний (Лукашик С.П. и др., 2019; Koti R. et al., 2020). Следовательно, поиск альтернативных путей для активации регенерации печени в условиях ее повреждения является актуальной проблемой. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, являются самообновляющимися клетками, которые можно найти практически во всех постнатальных органах и тканях, включая печень (Щастный А.Т. и др., 2017; Jiang W. et al., 2018; Gazdic M. et al., 2018; Zhao L. et al., 2018;). За последнее десятилетие был достигнут большой прогресс в области ММСК-зависимой регенерации и иммуномодуляции печени.

Учитывая иммуномодулирующие характеристики ММСК, способность к выработке биологически активных веществ, а также к fusion эффекту, введение ММСК считается перспективным терапевтическим решением для терапии острой печеночной недостаточности (Feng L.Y., 2017; Vandermeulen M. et al., 2014; Buzhor E. et al., 2014; Greenbaum L. E. et al., 2019). Источниками получения ММСК на сегодняшний день являются не только жировая ткань, костный мозг, пупочный канатик, слизистая оболочка полости рта (десна), но и плацента. Обнаружено, что пролиферативный потенциал ММСК, полученных из плаценты, значительно выше, чем у ММСК, полученных из костного мозга (Abumaree M H. et al., 2017; Veeravolu N. et al., 2017). В тоже время получение плаценты не является инвазивной процедурой.

Также известно, что при старении уменьшается количество стволовых клеток в организме, снижается их способность к направленной миграции, ингибируется их чувствительность к действию факторов роста (Мещанинов В.Н. и др., 1994; Сазонов С.В. и др., 1999; Калинин А. Л., 2015; Morsiani C., 2019). Это приводит к снижению способности печени восстанавливать свою структуру и функцию в условиях повреждения. Одним из способов активации регенерации печени при старении может быть использование клеточных технологий.

Принимая во внимание биологические свойства плацентарных ММСК, особенности регенерации печени при старении, представляется перспективным изучение влияния этих клеток на изменение регенерации печени после ее повреждения и в условиях возрастной инволюции.

### **Степень разработанности проблемы**

В настоящее время опубликовано значительное количество работ о влиянии ММСК на регенерацию печени в условиях ее повреждения. В современной литературе имеются противоречивые данные о влиянии ММСК на морфометрические показатели печени после ее резекции. С одной стороны, авторы сообщают об отсутствии влияния ММСК на количество митозов, диаметр ядра гепатоцитов, площадь гепатоцитов и ядерно-цитоплазматическое

соотношение (Рудаков В.С и др., 2018, Alves A. et al., 2017). При этом в других публикациях показано увеличение массы печени на фоне ее резекции после трансплантации ММСК (Рудаков В.С и др., 2016, Feng L., 2017, Papanikolaou I. G. et al., 2017). Таким образом, непонятным остается за счет чего происходит увеличение массы печени.

В современной литературе отсутствуют публикации о воздействии плацентарных ММСК на регенерацию печени при старении организма.

### **Цель исследования**

Определение патофизиологической обоснованности использования плацентарных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток при повреждении печени в зрелом и старом организме.

### **Задачи исследования**

1. Проанализировать влияние плацентарных ММСК на биохимические показатели периферической крови и морфометрические показатели печени зрелых и старых лабораторных животных в физиологических условиях.
2. Оценить влияние плацентарных ММСК на биохимические показатели периферической крови и морфометрические показатели печени зрелых и старых лабораторных животных в условиях токсического поражения печени четыреххлористым углеродом.
3. Определить влияние плацентарных ММСК на биохимические показатели периферической крови и морфометрические показатели печени зрелых и старых лабораторных животных после её резекции.
4. Исследовать влияние плацентарных ММСК на уровень мутагенеза в печени зрелых и старых лабораторных животных в физиологических условиях, а также после резекции печени и её токсического поражения.
5. Оценить уровень запрограммированной клеточной гибели гепатоцитов у зрелых и старых лабораторных животных в условиях повреждения печени после трансплантации ММСК.

6. Сравнить механизмы регенерации печени в ответ на введение ММСК у зрелых и старых лабораторных животных в условиях токсического гепатита и после резекции печени.

### **Научная новизна исследования**

Впервые в настоящем исследовании было изучено влияние ММСК, выделенных из плаценты, на регенерацию печени в физиологических условиях, при токсическом поражении печени, а также после её резекции у зрелых и старых лабораторных мышей.

Впервые установлено, что трансплантация плацентарных ММСК после резекции печени и при её токсическом поражении обеспечивает восстановление биохимических и морфометрических показателей печени.

Впервые установлено ингибирование запрограммированной клеточной гибели и снижение уровня мутагенеза в печени, как у зрелых, так и у старых лабораторных животных при трансплантации ММСК на фоне повреждения печени.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Получены данные о влиянии трансплантации плацентарных ММСК на регенерацию печени в условиях её повреждения в зрелом и старом организме. После резекции печени у старых лабораторных мышей активируется внутриклеточная регенерация, в то время как при токсическом гепатите происходит повышение как клеточной, так и внутриклеточной регенерации.

Основываясь на полученных результатах, можно утверждать, что плацента является перспективным источником ММСК. Разработана схема влияния плацентарных ММСК на регенерацию печени при острой печеночной недостаточности у зрелых и старых лабораторных животных.

Результаты работы используются в учебном процессе кафедр патологической физиологии и гистологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Уральский

государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Результаты проведенного исследования внедрены в практику работы 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).

### **Методология и методы диссертационного исследования**

Для изучения влияния трансплантации плацентарных ММСК на регенерацию печени в условиях её повреждения у зрелых и старых лабораторных животных были поставлены методики резекции печени и токсического поражения печени. Отработаны методики по выделению и культивированию ММСК.

У лабораторных мышей проведен анализ результатов биохимических показателей периферической крови и морфометрических данных печени.

Комплекс лабораторных тестов соответствует современному методическому уровню экспериментальных и лабораторных исследований.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. При трансплантации плацентарных ММСК зрелым лабораторным животным в условиях повреждения печени восстановление морфофункционального состояния реализуется за счет активации клеточных и внутриклеточных механизмов регенерации.

2. Введение плацентарных ММСК старым лабораторным животным в условиях повреждения печени приводит к восстановлению ее морфофункционального состояния за счет активации внутриклеточных механизмов регенерации.

3. Трансплантация плацентарных ММСК зрелым и старым лабораторным животным в условиях повреждения печени приводит к снижению выраженности мутагенеза в печени.

4. У зрелых и старых лабораторных животных в условиях повреждения печени при введении ММСК происходит снижение запрограммированной клеточной гибели гепатоцитов.

### **Степень достоверности, апробация результатов и личный вклад автора**

В работе представлены данные, полученные лично автором или при его непосредственном участии во всех этапах экспериментальных исследований.

Достоверность научных результатов и обоснованность выводов подтверждается достаточным объемом экспериментальных исследований, использованием современных методов, адекватных поставленной цели и задачам; статистической обработкой полученных данных и публикацией материалов диссертации в статьях, докладах на научных конференциях.

Основные результаты исследований доложены и обсуждены на всероссийской конференции с международным участием “StemCellBio-2018: Фундаментальная наука как основа клеточных технологий” (г. Санкт-Петербург, 2018 г.); IV Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов «Актуальные проблемы медико-биологических дисциплин» (г. Саранск, 2019 г.); Международная научно-практическая конференция «Современная наука: актуальные вопросы, достижения и инновации» (Беларусь, г. Минск, 2019); VIII Межрегиональной научно-практической конференции, посвященной 80-летию со дня рождения член-корр. РАН, д.м.н., профессора А.П. Ястребова "Клеточные технологии — практическому здравоохранению 2019" (г. Екатеринбург, 2019 г.).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 10 научных работ, в том числе 3 публикации — в печатных изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации для публикации основных материалов кандидатских и докторских диссертаций, 2 публикации — в журналах, индексируемых в международной базе (Scopus).

### **Структура и объём диссертации**

Работа написана на русском языке, изложена на 185 страницах машинописного текста и состоит из введения, 3-х глав, общего заключения, выводов, списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 28 рисунками и 77 таблицами. Список литературы включает 193 источников, из них 63 отечественных, 130 зарубежных авторов.

## СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Материалы и методы исследования

Эксперименты проведены на 262 аутбредных белых мышах. Зрелые мыши самцы в возрасте 7-8 мес., массой 28-30 г. Старые мыши самцы 17-18 мес., массой 34-36 г. ММСК выделены из хориона плаценты мышей-самок в возрасте 3-4 мес., массой 27-29 г.

Животные содержались на стандартном рационе питания в условиях лабораторного вивария при температуре +18°C, определенных в Приказе Минздрава России №199н от 01.04.2016 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики». Выполнение экспериментальных исследований проводилось на основе этических принципов, декларированных Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986). Выполнение исследований одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России протокол № 2 от 16.02.2018.

В зависимости от возраста животные были разделены на 2 группы (старые и зрелые). Внутри каждой группы были выделены 2 подгруппы (опытная и контрольная) по 7 мышей в каждой. Интактные мыши – это мыши, у которых не моделировалась патология печени (без резекции печени и токсического гепатита). Для выделения ММСК из плаценты были использованы беременные мыши-самки в количестве 10 особей. Регенераторные процессы в печени после её резекции и моделирования токсического гепатита индуцировали путем внутривенного введения через 1 час после моделирования патологического воздействия ММСК в количестве 4 млн. кл. /кг массы тела. Выведение животных из эксперимента производили на 1, 3 и 7 сутки.

**Культивирование и субкультивирование ММСК.** Культивирование ММСК проводилось в условиях CO<sub>2</sub> – инкубатора при температуре 37°C с содержанием углекислого газа 5% и влажностью 90 %. Для трансплантации лабораторным животным были использованы клетки третьего пассажа. Состав специализированной среды для культивирования ММСК: MesenCult MSC Basal

Medium Mouse и MesenCult™ Proliferation Supplements Mouse («StemCell Technologies», Канада) в соотношении 4 : 1. Также в состав данной среды входило 2 ммоль раствора L- глутамина («StemCell Technologies», Канада) и антибиотики – пенициллин 50 ед./мл и стрептомицин 50 мкг/мл («StemCell Technologies», Канада).

### **Идентификация ММСК.**

ММСК - это клетки, способные к дифференцировке в остеогенном и адипоцитарном направлении. Также ММСК характеризуются следующим иммунофенотипом: позитивные маркеры - интегрин- $\beta$ 1, Sca1, ICAM -1, CD29, CD 54, CD 90, CD105, негативные маркеры - CD 14, CD 34, CD45. Для идентификации ММСК была проведена их дифференцировка в остеогенном и адипоцитарном направлении.

Остеогенная дифференцировка подтверждена гистохимическим методом регистрации увеличения экспрессии щелочной фосфатазы, а также с помощью окраски von Kossa, выявляющей наличие минерализованного фосфата кальция.

Адипоцитарная дифференцировка установлена гистохимическим методом регистрации нейтральных липидных вакуолей, окрашивающихся красителем Oil Red O («Sigma», США).

Идентификация ММСК иммуноцитохимическим методом проводилась с использованием набора - MILLIPORE®'s Mesenchymal Stem Cell Characterization Kit (Millipore, США). Этот набор содержит панель антител к позитивным (интегрин- $\beta$ 1, CD 54, фибронектин, коллаген I типа) и негативным маркерам культуры ММСК (CD 14 и CD45).

Количество жизнеспособных клеток была определена с помощью суправитальной окраски раствором трипанового синего. Жизнеспособность выделенных клеток перед трансплантацией составила 93,5 %.

**Оценка хоуминга ММСК.** Для оценки хоуминга ММСК проведены исследования на 20 белых лабораторных крысах-самцах возраста 6-8 мес. Резекция 70 % печени у крыс выполнена по методике G.M. Higgins, R.M. Anderson. Введение клеток, меченных акридиновым оранжевым, проводили в

хвостовую вену через 1 час после выполнения резекции в дозе 4 млн.кл./кг. массы тела. Анализ распределения ММСК проводился через 3 и 24 часа.

Гистологические препараты печени анализировались с помощью флуоресцентного микроскопа Carl Zeiss (Германия) при увеличении  $\times 400$ . Производился анализ количества клеток в тканях в процентах от введенных ММСК.

### **Моделирование патологического воздействия.**

Метод частичной 2/3 гепатэктомии у мышей (Claudia Mitchell, Holger Willenbring, 2008). Оперативное вмешательство на лабораторных мышах проводилось под наркозом с использованием форана с помощью аппарата ингаляционного наркоза Полиаркон-12 (Медсиликон, Россия).

С целью моделирования токсического гепатита производилось введение 50 мкг/кг раствора  $CCl_4$  на оливковом масле однократно внутрибрюшинно.

**Биохимический анализ периферической крови.** Производилась оценка биохимических показателей периферической крови на автоматическом биохимическом и иммуноферментном анализаторе Chem Well 2910 (Combi, США) на 1, 3, 7 сутки после трансплантации клеток. Изучались следующие биохимические показатели: общий белок, альбумин, мочевины, глюкоза, общий билирубин, аспартатаминотрансфераза (АСТ), аланинаминотрансфераза (АЛТ), щелочная фосфатаза (ЩФ). При определении биохимических показателей использовались наборы компании «SPINREACT», Испания.

Определение концентрации фибриногена в плазме крови было проведено на анализаторе показателей гемостаза АПГ2-02-П (Россия).

**Морфометрические показатели печени.** Для оценки массы печени производилось её взвешивание на аналитических весах (CE 124-C, Россия). Подготовку образцов печени для гистологического исследования осуществляли на автоматическом процессоре Leica EG 1160 (Leica, Германия) с последующей заливкой в парафин. Гистологические срезы печени толщиной 3-5 мкм окрашивали гематоксилином-эозином. Для морфометрического анализа данных использовали компьютерную программу анализа изображений (Biovision, Россия).

С этой целью производили микрофотосъемку случайных полей зрения гистологических препаратов цифровой камерой CAM V 400 (Vision, Австрия) на базе микроскопа Primo Star (Carl Zeiss, Германия) при увеличении  $\times 100$ ,  $\times 400$ ,  $\times 1000$  (не менее 10 полей зрения в каждом гистологическом срезе). Производилась оценка следующих морфометрических показателей печени: количество гепатоцитов на  $1 \text{ мм}^2$ , площадь гепатоцитов, площадь ядра гепатоцита, площадь цитоплазмы гепатоцита = площадь гепатоцита – площадь ядра гепатоцита, ядерно-цитоплазматический индекс (ЯЦИ), количество двухъядерных гепатоцитов на  $1 \text{ мм}^2$ , митотический индекс (МИ). Ядерно-цитоплазматический индекс (ЯЦИ) определяли, как отношение ядра и цитоплазмы клетки. Митотический индекс выражали в промилле (‰), то есть количество митозов на 1000 клеток.

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

Гистологические препараты печени анализировались с помощью флуоресцентного микроскопа Axio Imager (Carl Zeiss, Германия) при увеличении  $\times 400$ .

Микроядерный тест на гепатоцитах проводился по методике микроядерного теста на гепатоцитах мышей (Баглей Е.А., Недопитанская Н.Н., Лисовская В.С., 2014).

**Статистическая обработка полученных результатов.** Статистическую обработку результатов проводили с использованием стандартного пакета программ Statistica 6.0. Полученные данные обрабатывались вариационно-статистическим методом с использованием t-критерия Стьюдента. При отсутствии нормальности распределения статистическую значимость различий определяли, используя непараметрический критерий Манна-Уитни (U). Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждения

В настоящей работе проведены исследования по изучению направленного движения ММСК в физиологических условиях и после резекции печени. Обнаружено большее содержание трансплантированных ММСК в печени после её резекции. Повышенное содержание меченных акридин оранжевым ММСК в печени на фоне её резекции по сравнению с физиологическими условиями свидетельствует о наличии направленного движения ММСК в поврежденный орган.

Проведенные исследования позволили определить особенности влияния плацентарных ММСК на регенерацию печени в физиологических условиях и в условиях её повреждения у зрелых и старых лабораторных мышей.

Было установлено, что в физиологических условиях ММСК, выделенные из плаценты, не оказывают влияния на структуру и функцию печени.

На первые сутки на фоне резекции печени после трансплантации ММСК у зрелых и старых лабораторных животных не обнаружено достоверных различий изучаемых биохимических, морфометрических показателей, а также числа клеток с микроядрами между показателями контрольной и опытной подгрупп.

На третьи сутки после частичной гепатэктомии у зрелых лабораторных мышей выявлено, что активность АЛТ, АСТ и щелочной фосфатазы существенно меньше, чем у лабораторных животных без введения ММСК.

Снижение содержания ферментов цитолиза в периферической крови обусловлено уменьшением числа разрушающихся гепатоцитов вследствие трансплантации ММСК. Одним из возможных механизмов, с помощью которых ММСК способствуют активации регенерации печени, является их способность продуцировать противовоспалительные факторы, такие как IL 10, TGF- $\beta$ , PGE<sub>2</sub> (Tsuchiya A. et al, 2017; Wang Y. et al, 2018; Liu Y. et al, 2019). Выделение простагландина E<sub>2</sub> способствует снижению способности моноцитов дифференцироваться в дендритные клетки и продуцировать синтез провоспалительных цитокинов. Простагландин E<sub>2</sub> вместе с трансформирующим фактором роста  $\beta$  уменьшают пролиферацию, цитотоксическую активность и

выделение  $\gamma$ -IFN Т-лимфоцитами и NK-клетками (Liu J. et al., 2019). Интерлейкин-10 влияет на дендритные клетки, ингибируя синтез TNF- $\alpha$  и их способность активировать лейкоциты (Wang J. et al., 2018). Подобное иммуномодулирующее действие ММСК приводит к снижению степени выраженности проявлений вторичной альтерации.

Старые лабораторные животные не ответили изменением биохимических показателей периферической крови на трансплантацию ММСК после резекции печени. Трансплантация ММСК в это время у зрелых и старых лабораторных мышей, также как и на первые сутки, не привела к возникновению различий изучаемых морфометрических показателей между показателями контрольной и опытной подгрупп. Введение ММСК после частичной гепатэктомии на третьи сутки у зрелых и старых лабораторных животных не привело к изменению апоптотического и митотического индексов, количества клеток с микроядрами в печени.

На седьмые сутки после частичной гепатэктомии у зрелых лабораторных мышей в ответ на трансплантацию ММСК произошло восстановление активности АСТ, АЛТ, щелочной фосфатазы, содержания фибриногена до значений интактных животных (рисунок 1).

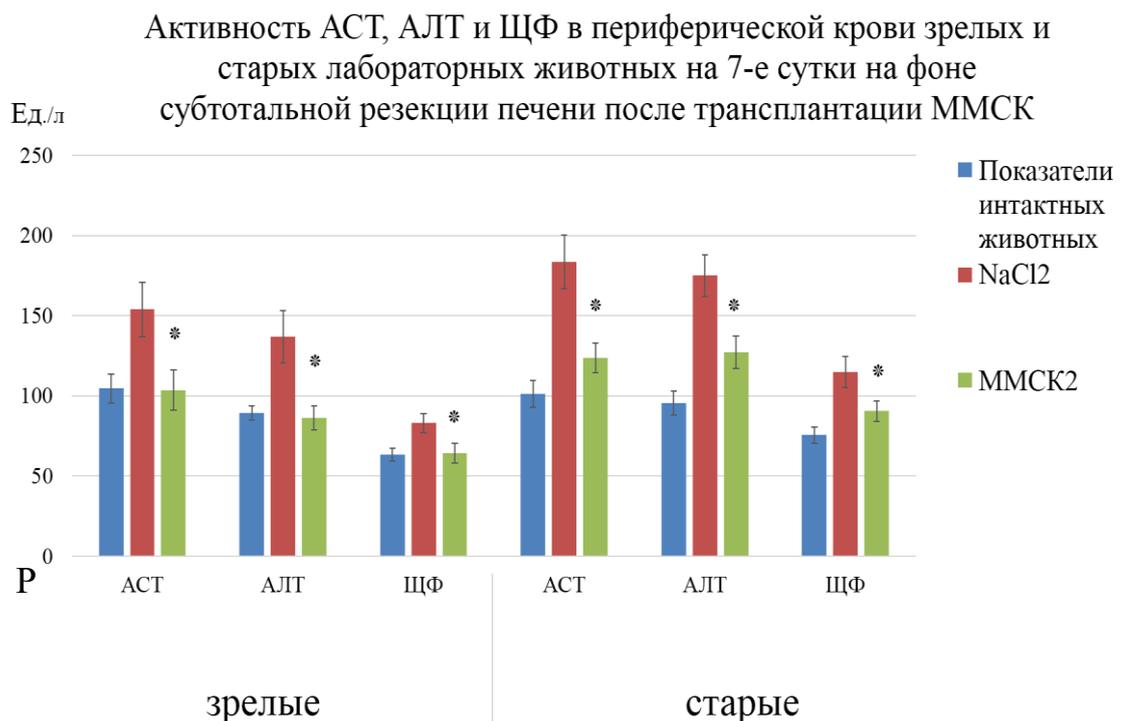


Рисунок 1. \* - отличие от лабораторных мышей с частичной гепатэктомией без введения ММСК, достоверно с  $p < 0,05$ .

При этом у старых лабораторных мышей показатели активности АСТ, АЛТ, щелочной фосфатазы также снизились относительно контрольной подгруппы, но не достигли значений интактных животных. Уровень фибриногена у старых животных после введения ММСК повысился по сравнению с контрольной подгруппой. У зрелых лабораторных животных отмечено достоверное повышение уровня мочевины. Остальные изучаемые показатели белкового, углеводного, пигментного обменов в обеих возрастных группах на фоне введения ММСК не достигли значений интактных животных.

Анализ данных морфометрического исследования печени зрелых лабораторных животных на фоне частичной гепатэктомии после трансплантации ММСК свидетельствует об активации клеточной регенерации в печени (повышение митотического индекса) и внутриклеточной регенерации (увеличение количества двухъядерных гепатоцитов и ядерно-цитоплазматического индекса, за счет увеличения площади ядра гепатоцитов). В тоже время у старых лабораторных мышей отмечалось только повышение показателей, характеризующих внутриклеточную регенерацию (увеличение количества двухъядерных гепатоцитов и ядерно-цитоплазматического индекса за счет увеличения площади ядра гепатоцитов).

Активация клеточной регенерации под действием введенных ММСК может быть обусловлена продуцируемыми ими факторами роста (Afshari A. et al., 2020). Важную роль в восстановлении морфометрических показателей печени могут играть вырабатываемые ММСК факторы роста – фактор роста гепатоцитов (HGF), эпидермальный фактор роста (EGF), фактор стволовой клетки (SCF) (Ishigami A., 1993; Michalopoulos G. K., 2010; Papanikolaou I. G. et al., 2017). Известно, что при старении происходит снижение продукции собственных факторов роста, влияющих на регенерацию гепатоцитов (Лепехова С.А., 2014; Ling K. X. et al., 2016; Wang K. et al., 2017). Снижение чувствительности гепатоцитов к факторам роста приводит к отсутствию эффекта от трансплантации

ММСК на клеточную регенерацию. Снижение пролиферативной способности гепатоцитов при старении может быть реализовано также в результате подавления циклин-зависимых киназ вследствие взаимодействия их с хроматином, ремоделированным протеином Vim, который экспрессируется в стареющих гепатоцитах. С возрастом вместе со снижением регенераторной способности снижается длина теломер, особенно в условиях повреждения печени (Калинин А. Л., 2015; Takubo K. et al., 2000). Активация внутриклеточной регенерации характерна для обеих возрастных групп. Это может обеспечиваться способностью ММСК к слиянию (fusion effect) с клетками печени.

В обеих возрастных группах на фоне резекции печени после трансплантации ММСК к седьмым суткам впервые было определено повышение массы печени по сравнению с контрольной подгруппой. Также было отмечено снижение апоптотического индекса и уменьшение числа клеток с микроядрами по сравнению с контролем. Эти изменения могут быть вызваны способностью ММСК посредством межклеточных контактов вызывать экспрессию генов, кодирующих синтез белков теплового шока с молекулярной массой 70 кДа (Li T. et al., 2018). Белки теплового шока (70 кДа) являются шаперонами, обеспечивающими стабильность структурных и функциональных белков клетки. Также известно, что белки теплового шока участвуют в защите клеток от стрессиндуцируемого апоптоза, блокируя пути его активации и стабилизируя клеточные структуры (Жданов Д.Д., 2007; Никитин К. Д., 2008; Yu J. M. et al., 2011).

При трансплантации ММСК у зрелых и старых лабораторных мышей на первые сутки на фоне токсического поражения печени не обнаружено различий в изучаемых морфометрических и биохимических показателях между данными контрольной и опытной подгрупп. Данные апоптотического, митотического индексов и числа клеток с микроядрами между показателями контрольной и опытной подгрупп зрелых и старых лабораторных животных также не отличались.

На третьи сутки после введения четыреххлористого углерода зрелым и старым лабораторным животным показано, что трансплантация ММСК привела к существенному снижению активности АЛТ и АСТ в периферической крови по сравнению с лабораторными животными без введения ММСК. Уменьшение гибели клеток можно объяснить не только способностью ММСК к синтезу противовоспалительных факторов, но и способностью ММСК активироваться при взаимодействии с «воспалительным окружением», в частности с IFN  $\gamma$ . Данное взаимодействие приводит к повышенной продукции ММСК NO-синтазы и, как следствие, монооксида азота (NO), а также хемокинов CCL9, CCL11 и CCL12 и к повышенной экспрессии молекул адгезии ICAM-1 и VCAM-1. NO подавляет пролиферацию Т-лимфоцитов, в то время как выделяемые ММСК цитокины способствуют миграции Т-клеток непосредственно в зону высокой концентрации NO. Повышенная же экспрессия молекул ICAM-1 и VCAM-1 приводит к «адгезии» Т-лимфоцитов к ММСК и удержанию иммунных клеток в зоне действия высокой концентрации активной формы NO (Рудаков В.С. и др., 2018). В то же время, у зрелых лабораторных животных на третьи сутки на фоне введения четыреххлористого углерода после трансплантации ММСК изменились морфометрические показатели, характеризующие повышение активности как клеточной регенерации (митотический индекс), так и внутриклеточной регенерации (площадь ядра гепатоцитов, ядерно-цитоплазматический индекс, количество двухъядерных гепатоцитов). При этом у старых лабораторных мышей было достоверно отмечено изменение морфологических показателей, характеризующих только повышение активности клеточной регенерации (площадь ядра гепатоцитов, ядерно-цитоплазматический индекс, количество двухъядерных гепатоцитов).

В то же время в обеих возрастных группах после введения ММСК на фоне токсического гепатита отмечено снижение апоптотического индекса по сравнению с контрольной подгруппой.

У зрелых лабораторных животных, в отличие от старых, на фоне формирования токсического гепатита после трансплантации ММСК к третьим

суткам впервые было определено уменьшение числа клеток с микроядрами по сравнению с контролем.

У зрелых и старых лабораторных мышей на седьмые сутки в ответ на трансплантацию ММСК произошло восстановление содержания АСТ до значений интактных животных. При этом содержание АЛТ также существенно снизилось (рисунок 2).

У зрелых лабораторных животных в отличие от старых выявлено снижение активности щелочной фосфатазы и повышение содержания общего белка, альбуминов до значений интактных лабораторных животных. В то же время у старых лабораторных мышей показатель фибриногена повысился по сравнению с контролем, а остальные показатели белкового обмена достоверно не отличались от данных в контрольной подгруппе (рисунок 3).

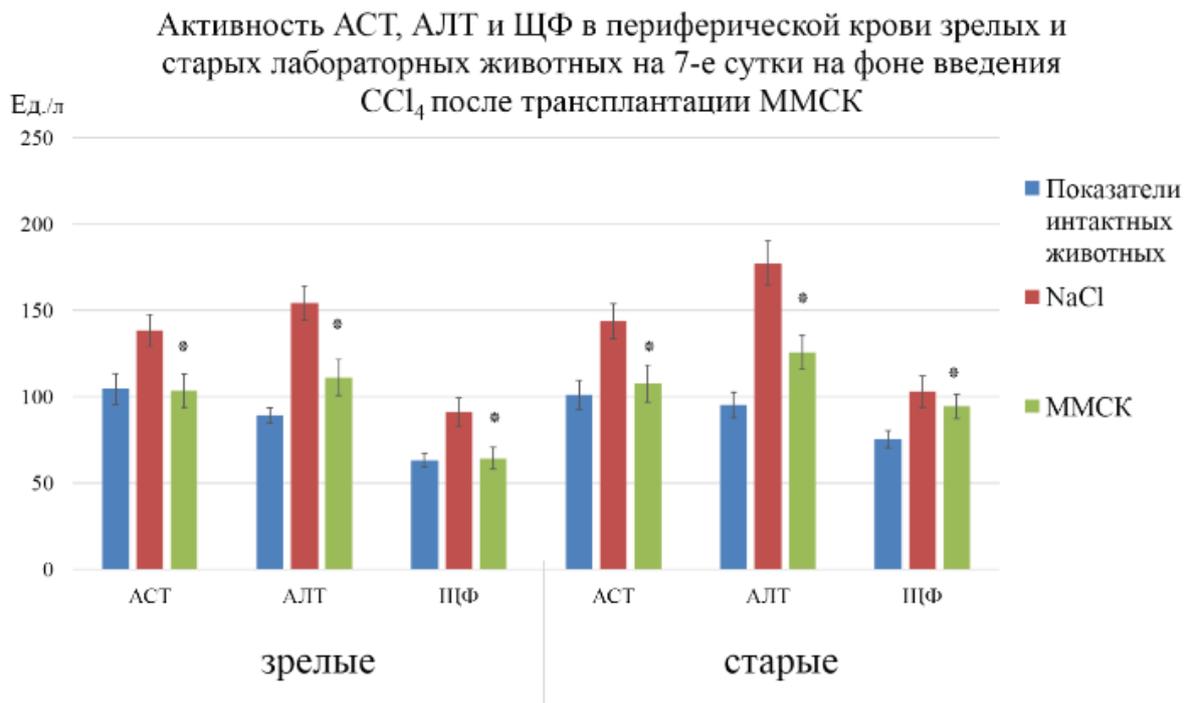


Рисунок 2. \* - отличие от лабораторных мышей с токсическим гепатитом без введения ММСК, достоверно с  $p < 0,05$ .

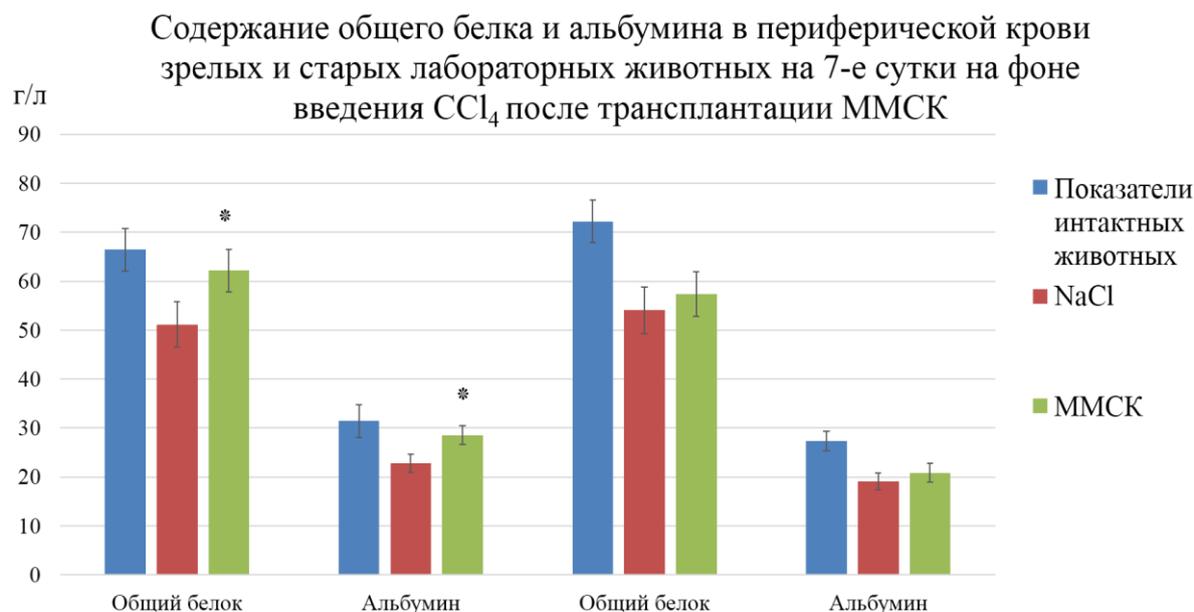


Рисунок 3. \* - отличие от лабораторных мышей с токсическим гепатитом без введения ММСК, достоверно с  $p < 0,05$ .

Полученные данные морфометрического исследования свидетельствуют, что на седьмые сутки у зрелых и старых лабораторных животных можно отметить снижение апоптотического индекса (рисунок 4), уменьшение числа гепатоцитов с микроядрами (рисунок 5) и увеличение активности клеточной и внутриклеточной регенерации на фоне трансплантации ММСК.

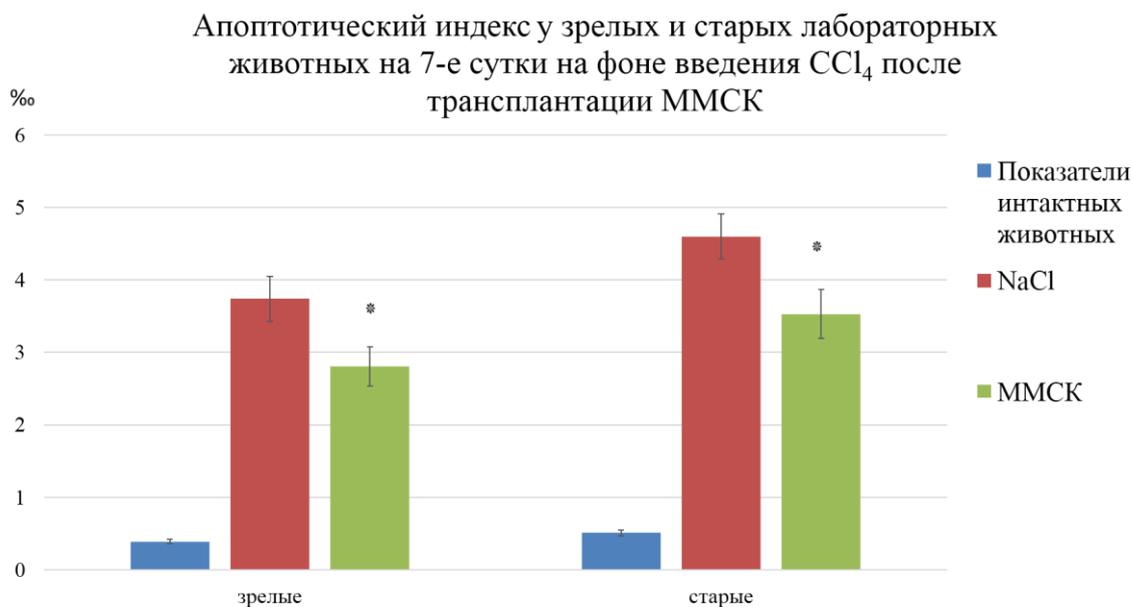


Рисунок 4. \* - отличие от лабораторных мышей с токсическим гепатитом без введения ММСК, достоверно с  $p < 0,05$ .

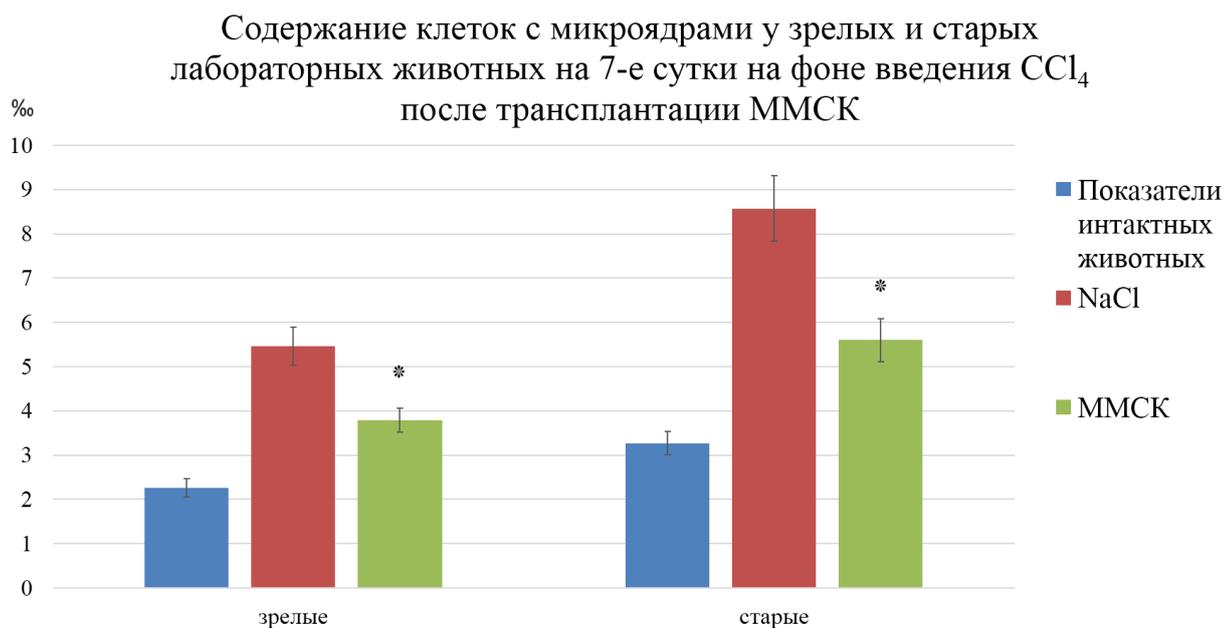


Рисунок 5. \* - отличие от лабораторных мышей с токсическим гепатитом без введения ММСК, достоверно с  $p < 0,05$ .

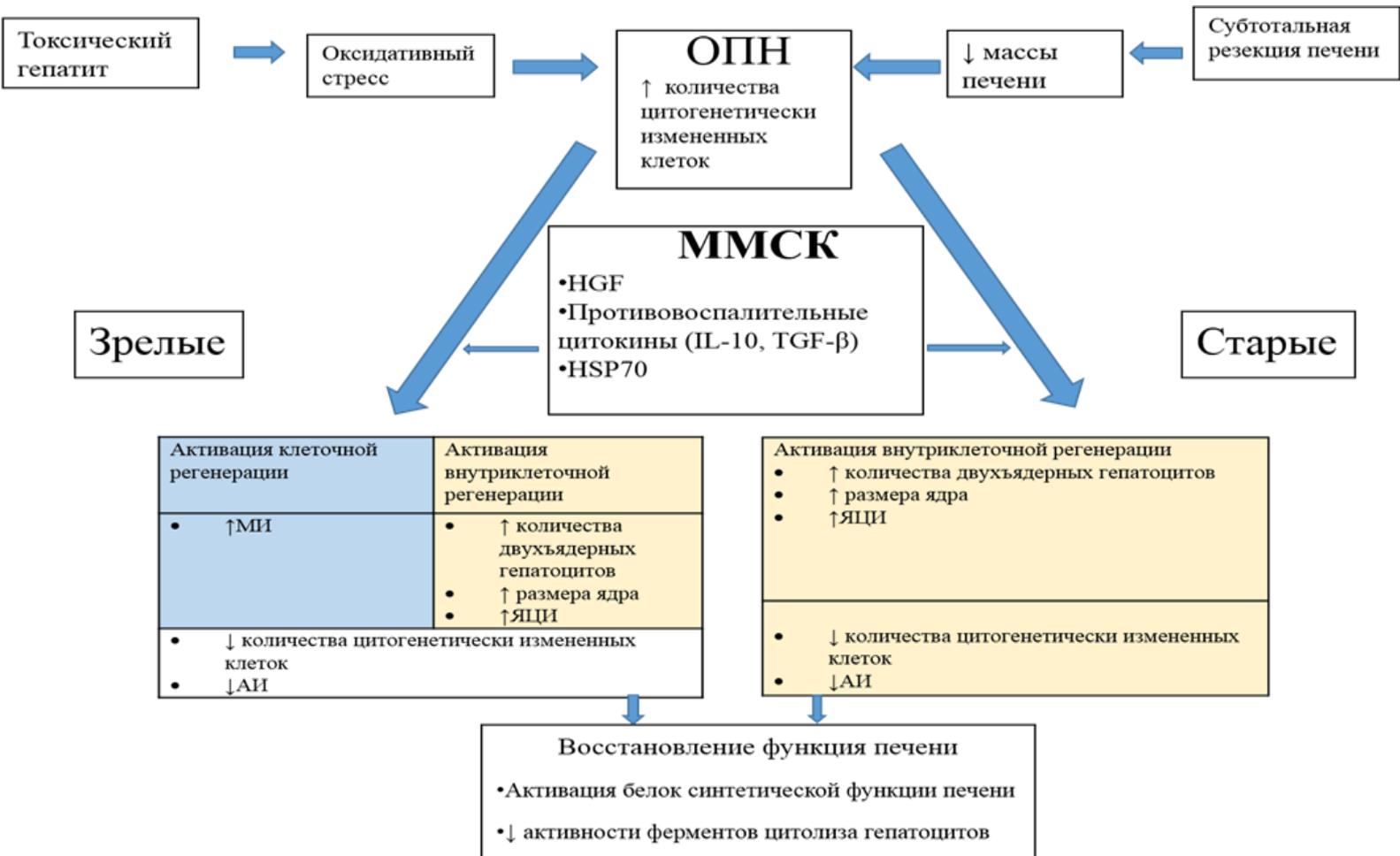
При этом у старых лабораторных мышей механизмы клеточной регенерации (увеличение митотического индекса) после введения ММСК в условиях токсического повреждения печени, были обнаружены лишь на седьмые сутки после введения ММСК.

Выявленные эффекты могут быть обусловлены биологическими особенностями ММСК: способностью к дифференцировке в гепатоциты, синтезу факторов роста, продукции противовоспалительных факторов, способностью к fusion эффекту и возможности посредством межклеточных контактов обеспечивать внутриклеточный синтез белков теплового шока с молекулярной массой 70 кДа.

Таким образом, трансплантация плацентарных ММСК зрелым и старым лабораторным животным в условиях повреждения печени вызывает активацию ее регенерации. При этом в зависимости от возраста организма, вида экстремального воздействия характер действия трансплантированных плацентарных ММСК отличается. Доказано, что в условиях резекции печени у зрелых лабораторных мышей регенерация печени на фоне введения ММСК реализуется через клеточные и внутриклеточные механизмы регенерации. В то время как у старых

лабораторных мышей восстановление данного органа происходит преимущественно за счет внутриклеточных механизмов (схема 1).

**Схема 1. Влияние ММСК на регенерацию печени в условиях её повреждения в зрелом и старом организме**



**Выводы**

1. Активация процессов регенерации печени после её повреждения при трансплантации ММСК зависит от возраста и от характера воздействия.
2. Трансплантация ММСК при резекции печени и токсическом гепатите у зрелых лабораторных животных стимулирует клеточные и внутриклеточные механизмы регенерации печени, в то время как у старых животных регенерация печени реализуется преимущественно за счет внутриклеточных механизмов.

3. При трансплантации плацентарных ММСК зрелым и старым лабораторным животным в физиологических условиях не происходит изменений биохимических показателей периферической крови и морфометрических показателей печени.
4. Введение плацентарных ММСК зрелым и старым лабораторным животным после резекции печени, а также в условиях ее токсического поражения обеспечивает снижение показателей, отражающих цитолиз гепатоцитов.
5. Плацентарные ММСК у зрелых лабораторных животных в условиях токсического гепатита обеспечивают более выраженное восстановление белок синтетической функции печени по сравнению со старыми животными.
6. Трансплантация плацентарных ММСК после резекции печени и при её токсическом повреждении обеспечивает снижение мутагенеза, активности запрограммированной клеточной гибели. Этот эффект более выражен у зрелых лабораторных животных.

### **Практические рекомендации**

1. При проведении патогенетической терапии острой печеночной недостаточности для активации регенераторных процессов рекомендуется применение плацентарных ММСК в количестве 4 млн. кл./кг.
2. Для снижения уровня мутагенеза, ингибирования выраженности запрограммированной клеточной гибели гепатоцитов при повреждении печени рекомендуется применение аллогенной трансплантации плацентарных ММСК.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **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.**

2. К вопросу о клеточной регуляции регенерации печени / В.В. Базарный, И.Ю. Маклакова, Д.Ю. Гребнев [и др.] // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2019. – Т. 16, № 3. – С. 357-365.

3. 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 [и др.] // Успехи геронтологии. – 2019. – Т.32, № 3. – С. 370-375.

4. Юсупова В.Ч. Изменение морфометрических показателей печени зрелых и старых лабораторных животных в условиях токсического гепатита на фоне введения ММСК / В.Ч. Юсупова // Сборник материалов всероссийской конференции с международным участием StemCellBio-2018: фундаментальная наука как основа клеточных технологий». - Санкт – Петербург 2018. – С. 120.

5. Изучение хоуминга ММСК у крыс с резецированной печенью / М.А. Порошин, Р.О. Быков, И.Ю. Маклакова [и др.] // III Международная научно-практическая конференция молодых ученых и студентов «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения». – Екатеринбург, 2018 г. – С. 1218-1222.

6. Влияние трансплантации ММСК на изменение морфометрических показателей печени зрелых и старых лабораторных животных в условиях токсического гепатита / Д.Ю. Гребнев, И.Ю. Маклакова, В.Ч. Вахрушева [и др.] // Материалы международной научно-практической конференции «Современная наука: актуальные вопросы, достижения и инновации». – Минск, Беларусь, 2019. – С.92-96.

7. Влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток на регенерацию печени в условиях её резекции / В.Ч. Юсупова, И.Ю. Маклакова, Д.Ю. Гребнев [и др.] // Гены и клетки. – 2019. – Т. 14. №3. – С. 122-123.

8. 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.

9. Юсупова В.Ч. Влияние трансплантации ММСК на изменение морфометрических показателей печени зрелых и старых лабораторных животных в условиях токсического гепатита / Актуальные проблемы медико-биологических дисциплин Сборник научных трудов IV Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых, аспирантов, студентов / под ред. Л.В. Матвеевой. – 2019. – С. 399-402.

10. 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 [и др.] // Морфология. – 2020. – Т. 157. №1. – С. 55-60.

**Список сокращений**

АИ – апоптотический индекс

АЛТ – аланинаминотрансфераза

АСТ – аспаратаминотрансфераза

ДК – дендритная клетка

ИЛ – интерлейкин

МИ – митотического индекс

ММСК – мультипотентная мезенхимальная стромальная клетка

ОПН – острая печеночная недостаточность

ПГ – простагландин

AR – амфирегулин

EGF – эпидермальный фактор роста

FBS – фетальная бычья сыворотка

HGF – фактор роста гепатоцитов

HSP – белок теплового шока

IFN –  $\gamma$  – гамма интерферон

IL-6 – интерлейкина-6

LPS – липополисахарид

NK – натуральный киллер, клетка

PGE2 – простагландин E2

SCA-1 – антиген стволовой клетки-1

SCF – фактор стволовых клеток

SDF-1 – стромой вырабатываемый фактор-1

TGF- $\beta$  – трансформирующий фактор роста- $\beta$

TNF – фактора некроза опухоли

**ВАХРУШЕВА ВИКТОРИЯ ЧАУКАТОВНА**

**ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ  
ПЛАЦЕНТАРНЫХ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ  
СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ ПЕЧЕНИ В ЗРЕЛОМ И  
СТАРОМ ОРГАНИЗМЕ**

14.03.03-Патологическая физиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Екатеринбург – 2020

---

Автореферат напечатан по решению диссертационного совета Д 208.102.03 от  
26.06.2020 г.