

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Уральский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

**Вахрушева
Виктория Чаукатовна**

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

14.03.03—Патологическая физиология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, доцент
Гребнев Дмитрий Юрьевич

Екатеринбург—2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	5
Глава 1.....	14
Свойства мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и их использование в лечении острой печеночной недостаточности (обзор литературы)	14
Биологические свойства мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК)	14
Иммунорегуляторные свойства ММСК	16
Плацента как источник ММСК	20
Особенности регенерации печени	21
Регенерация печени при повреждении	21
Роль Купферовских клеток в регенерации печени.....	23
Изменения регенерации печени при старении	25
Альтернативные пути решения проблемы дефицита донорских органов	29
Экспериментальные модели острой печеночной недостаточности	29
Хирургические модели на животных	29
Химические модели на животных	31
Заключение.....	36
Глава 2	37
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	37
2.1. Общая характеристика лабораторных животных.....	37
2.2. Экспериментальное планирование беременности	38
2.3. Выделение, культивирование и субкультивирование ММСК.....	39
2.4. Идентификация ММСК	40
2.4.1. Дифференцировка в остеогенном направлении	40
2.4.2. Дифференцировка в адипоцитарном направлении	43
2.4.3. Идентификация ММСК иммуноцитохимическим методом	45
2.4.4. Иммунофенотипирование ММСК.....	47
2.5. Подсчет и определение жизнеспособности клеток	49
2.6. Оценка хоуминга ММСК.....	50
2.7. Моделирование субтотальной резекции печени у животных.....	51
2.8. Моделирование токсического гепатита у животных	53

2.9. Методы оценки состояния регенераторных процессов в печени	54
2.9.1. Биохимический анализ крови	54
2.9.2. Определение концентрации фибриногена в плазме крови	54
2.9.3. Морфометрические показатели	55
2.9.4. Определение выраженности апоптоза	55
2.9.5. Микроядерный тест на гепатоцитах мышей.	58
2.10. Статистическая обработка полученных результатов.	59
Глава 3	61
Влияние трансплантации ММСК на морфофункциональное состояние неповрежденной и поврежденной печени мышей	61
Часть I. Оценка хоуминга мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в физиологических условиях и после субтотальной резекции.....	61
Часть II. Биохимические и морфометрические показатели зрелых и старых мышей после трансплантации ММСК в физиологических условиях.....	64
2.1. Биохимические показатели периферической крови зрелых и старых мышей после трансплантации ММСК в физиологических условиях.....	64
2.2. Морфометрические показатели печени зрелых и старых мышей после трансплантации ММСК в физиологических условиях	68
Часть III. Биохимические и морфометрические показатели после трансплантации ММСК зрелых и старых мышей с субтотальной резекцией печени	72
3.1. Биохимические показатели периферической крови после трансплантации ММСК зрелых и старых мышей с субтотальной резекцией печени	73
3.2. Морфометрические показатели печени после трансплантации ММСК у зрелых и старых мышей с субтотальной резекцией печени	87
Часть IV. Биохимические и морфометрические показатели после трансплантации ММСК у зрелых и старых мышей с токсическим гепатитом .	101
4.1. Биохимические показатели периферической крови после трансплантации ММСК у зрелых и старых мышей с токсическим гепатитом.....	102
4.2. Морфометрические показатели печени после трансплантации ММСК зрелых и старых мышей с токсическим гепатитом.....	115
Часть V. Сравнительная характеристика биохимических и морфометрических показателей после трансплантации ММСК зрелых и старых мышей в физиологических условиях, в условиях субтотальной резекции печени и токсического гепатита	131

Часть VI. Показатели микроядерного теста после трансплантации ММСК у зрелых и старых мышей в физиологических условиях, в условиях повреждения печени	142
6.1. Показатели микроядерного теста после трансплантации ММСК у зрелых и старых мышей в физиологических условиях	142
6.2. Показатели микроядерного теста после трансплантации ММСК у зрелых и старых мышей с субтотальной резекцией печени.....	143
6.3. Показатели микроядерного теста после трансплантации ММСК у зрелых и старых мышей с токсическим гепатитом	145
Общее заключение	148
Выводы	161
Практические рекомендации	162
Список сокращений	163
Список литературы	165

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

Печень – уникальный орган, обладающий исключительной регенеративной способностью [26]. 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 [49, 50]. Возрастающая печеночно-клеточная недостаточность является показанием для трансплантации печени пациенту [2, 127]. 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 [1, 27]. 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 [117, 141, 66, 59, 190, 175, 75]. За последнее десятилетие был достигнут большой прогресс в области ММСК-зависимой регенерации и иммуномодуляции печени.

Из-за их способности к выработке биологически активных веществ, а также из-за их иммуномодулирующих характеристик, введение ММСК считается перспективным терапевтическим решением для терапии острой печеночной недостаточности и цирроза печени [74, 67, 91, 102, 169, 76, 107].

Степень разработанности проблемы

В настоящее время опубликовано значительное количество работ о влиянии ММСК на регенерацию печени в условиях ее повреждения [6, 7, 8, 33, 36, 37].

Основными источниками получения ММСК на сегодняшний день являются жировая ткань, костный мозг, пупочный канатик, слизистая оболочка полости рта (десна).

При этом известно, что ММСК, выделенные из фетальных тканей по отношению к ММСК, полученным из тканей взрослого организма, обладают следующими преимуществами: получение неоперативным путем, большой пролиферативный потенциал [86, 69, 159, 70, 85, 129] и большая пролиферативная активность. В современной литературе имеются противоречивые данные о влиянии ММСК на морфометрические показатели печени после ее субтотальной резекции. С одной стороны, авторы сообщают об отсутствии влияния ММСК на количество митозов, диаметр ядра гепатоцитов, площадь гепатоцитов и ядерно-цитоплазматическое соотношение [51,127]. При этом в других публикациях показано увеличение массы печени на фоне ее резекции после трансплантации ММСК [52, 102, 144]. Таким образом, непонятным остается за счет чего происходит увеличение массы печени.

Известно, что при старении уменьшается количество стволовых клеток в организме, снижается их способность к направленной миграции, ингибируется их чувствительность к действию факторов роста. Это приводит к снижению способности печени восстанавливать свою структуру и функцию в условиях повреждения [38, 62, 63]. 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 в условиях субтотальной резекции печени.

4. Исследовать влияние плацентарных ММСК на уровень мутагенеза в печени зрелых и старых лабораторных животных в физиологических условиях, а также после субтотальной 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 субтотальной 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 при субтотальной резекции печени у зрелых и старых лабораторных животных.

Впервые установлено, что трансплантация плацентарных ММСК после субтотальной резекции печени обеспечивает восстановление биохимических и морфометрических показателей печени. Доказано, что введение ММСК вызывает восстановление в периферической крови активности маркеров цитолиза гепатоцитов (АЛТ, АСТ), щелочной фосфатазы как в зрелом, так и в старом организме. Доказан различный механизм активации регенерации печени после введения ММСК в изучаемых возрастных группах. У зрелых лабораторных животных повышение регенерации печени достигается за счет как клеточных, так и внутриклеточных механизмов. В то время как в старом организме регенерация реализуется за счет внутриклеточных механизмов.

Получены оригинальные данные о влиянии плацентарных ММСК на регенерацию печени в условиях ее токсического повреждения. Установлено, что в обеих возрастных группах со стороны биохимических показателей периферической крови выявлено уменьшение повышенного уровня трансаминаз (активность АЛТ, АСТ). У зрелых лабораторных животных отмечено восстановление белок синтетической функции печени на фоне введения ММСК.

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. Проведенные исследования свидетельствуют о способности старого организма реагировать на трансплантацию ММСК. Ответ старого организма на введение ММСК зависит от вида экстремального фактора. В условиях субтотальной резекции печени у старых лабораторных животных активизируется

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. Полученные данные свидетельствуют об эффективности использования ММСК выделенных из хориона плаценты в отношении активации регенерации печени в зрелом и старом организме при острой печеночной недостаточности. 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 организмов были поставлены методики субтотальной резекции печени и токсического поражения печени. Отработаны методики по выделению и культивированию ММСК.

У лабораторных животных 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 приводит к снижению 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.); 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

1. Маклакова И.Ю. Влияние трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток на биохимические показатели крови после резекции печени у зрелых и старых лабораторных животных / Успехи геронтологии // И.Ю. Маклакова, Д.Ю. Гребнев, В.Ч. Юсупова, И.В. Гаврилов, Е.А. Примакова. – 2018. – № 6, Т.31. – С. 933-936.

2. 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.

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

4. К вопросу о клеточной регуляции регенерации печени / В.В. Базарный, И.Ю. Маклакова, Д.Ю. Гребнев, В.Ч. Вахрушева, Е.М. Петрунина // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2019, Т. 16, № 3. – С. 357-365.

5. 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.

6. Гребнев Д.Ю. 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, Е.А. Примакова // Материалы международной научно-практической конференции «Современная наука: актуальные вопросы, достижения и инновации». – Минск, Беларусь, 2019. – С.92-96.

7. Юсупова В.Ч. 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.

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. Маклакова И.Ю. 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.

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.

ГЛАВА 1.

СВОЙСТВА МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ЛЕЧЕНИИ ОСТРОЙ ПЕЧЕНОЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Биологические свойства мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК)

ММСК это адгезивные, колониеобразующие клетки с высокой способностью к самовоспроизведению и пролиферации. ММСК способны дифференцироваться в направлении хондроцитов, остеобластов, адипоцитов [192, 163, 81, 73, 61].

Адгезивная способность это одно из основных свойств ММСК на которой основан способ их выделения [88]. ММСК, выделенные из костного мозга молодых доноров, обладают большим пролиферативным потенциалом и способны дифференцироваться в клетки поврежденного органа при хоуминге [113]. С возрастом количество ММСК и их пролиферативный потенциал снижаются. ММСК интенсивно размножаются *in vitro*. Несмотря на то, что ММСК человека можно сравнительно легко получить и культивировать в стандартных условиях, после длительного культивирования *in vitro* ММСК теряют потенциал пластичности.

Человеческие ММСК обычно выделяют из костного мозга после разделения центрифугированием в градиенте плотности. Мононуклеарные клетки культивируют в специализированной среде, а ММСК прикрепляются к пластику. ММСК могут быть выделены из разных локализаций, отличных от костного мозга, включая скелетные мышцы, жировую ткань, синовиальные оболочки, периодонтальные связки, менструальную кровь, пуповину, пуповинную кровь, амниотическую жидкость, плаценту [75]. Также из эмбриональных тканей, таких

как кровь, печень и костный мозг, надкостницу. Также, было высказано предположение, что клетки с мезенхимальными свойствами находятся практически во всех постнатальных органах и тканях. ММСК были изолированы и культивированы у многих других видов, включая мышей, крыс, кошек, собак, кроликов, свиней и бабуинов.

Фенотипически ММСК экспрессируют ряд маркеров, ни один из которых, к сожалению, характерен не только для ММСК. Известно, что взрослые человеческие ММСК не экспрессируют гемопоэтические маркеры CD45, CD34, CD14 или CD11. Они также не экспрессируют ко-стимулирующие молекулы CD80, CD86 или CD40 или молекулы адгезии CD31 (platelet/endothelial cell adhesion molecule), CD18 (leukocyte function-associated antigen-1) или CD56 (neuronal cell adhesion molecule-1) [31, 78, 143, 124].

ММСК экспрессируют CD105 (SH2), CD73 (SH3 / 4), CD44, CD90 (Thy-1), Sca-1 (stem cell antigen-1), CD71 и Stro-1, а также молекулы адгезии CD106 (vascular cell adhesion molecule), CD166 (activated leukocyte cell adhesion molecule), межклеточные молекулы адгезии (ICAM) -1 и CD29 [155, 153, 29, 177, 167].

Данные литературы свидетельствует, что ММСК выделенные из тканей лабораторных животных не экспрессируют все те молекулы адгезии, что и клетки человека. Человеческие и крысиные ММСК CD34 положительные, тогда как в некоторых работах сообщается о переменной экспрессии CD34 на мышинных ММСК. Общеизвестно, что все ММСК лишены гематопоэтического маркера CD45 и маркера эндотелиальных клеток CD31. Однако важно отметить, что на различия в экспрессии многих маркеров на поверхности клеток могут влиять факторы, секретируемые вспомогательными клетками в начале культивирования. Экспрессия *in vitro* некоторых маркеров ММСК не всегда коррелируют с их образцами экспрессии *in vivo*.

Существует также переменная экспрессия многих отмеченных маркеров из-за изменения источника ткани, метода выделения и культивирования [11, 32, 34, 35].

ММСК, культивируемые *in vitro*, обладают тремя биологическими свойствами, которые обеспечивают их использования в клеточной терапии: широкий потенциал дифференцировки, секреция трофических факторов, которые способствуют ремоделированию тканей, и иммунорегуляторные свойства [112, 119, 120, 130]. Благодаря этим особенностям ММСК обладают терапевтическим потенциалом при многих заболеваниях. Кроме того, ММСК дифференцируются в разные мезодермальные линии (адипоциты, хондроциты, остециты). Из-за этого потенциала дифференцировки, ММСК первоначально использовались при лечении несовершенного остеогенеза и при повреждении миокарда. Предполагалось, что положительный эффект, наблюдаемый при первоначальном использовании клеточной терапии, являются результатом остеогенного и миогенного дифференцирования. Нынешнее понимание состоит в том, что, помимо разнообразия мезодермальной дифференциации, преимущества ММСК возникают в том числе благодаря секреции трофических факторов и иммунорегуляторной способности [77, 139, 161, 146, 188, 184].

Иммунорегуляторные свойства ММСК

Многочисленные исследования продемонстрировали иммунорегуляторные свойства ММСК. ММСК влияют на иммунный ответ через их взаимодействие с клеточными компонентами врожденной (естественных киллерных клеток) и приобретенной (дендритных клеток), В-лимфоцитов и Т-лимфоцитов) иммунной системы. Иммунорегуляция ММСК может происходить через межклеточные контакты и секрецию различных факторов. Из-за этих свойств ММСК могут предотвращать нежелательную активацию Т-лимфоцитов и останавливать иммунный ответ во время заживления [114, 145].

Иммуносупрессивное действие на иммунокомпетентные клетки Т-лимфоциты.

Активированные лимфоциты размножаются и дифференцируются, чтобы выполнять свои эффекторные функции. ММСК модулируют каждую из этих фаз, тем самым влияя на иммунный ответ Т-лимфоцитов.

Во время активации Т-лимфоциты экспрессируют и секретируют молекулы, характерные для этой фазы, такие как CD25, CD69, CD38, цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген4 (CTLA-4) и человеческий лейкоцитарный антиген-DR (HLA-DR) и, кроме того, цитокины Interferon- γ (IFN γ), фактор некроза опухоли (TNF α) и IL-2, среди прочих.

Среди выявленных секретируемых факторов ММСК: трансформирующий фактор роста бета 1 (TGF β 1), фактор роста гепатоцитов (HGF), индоламин-2,3-диоксигеназа (IDO), простагландин E2 (PGE2), IL-10 и HLA-G5, тогда как запрограммированный смертельный лиганд 1 (PD-L1) и HLA-G1 задействованы в зависимых от контакта механизмах. Является ли прямой контакт между ММСК и Т-лимфоцитами необходимым для ингибирования пролиферации Т-клеток, остается спорным. Некоторые авторы предположили, что ММСК действуют через иммуносупрессивный механизм, не зависящий от контакта между клетками, тогда как другие указали, что контакт необходим для эффективной иммунорегуляции [103].

После активации при наличии повреждающего агента или признаков повреждения хелперные Т-клетки CD4 + (Th0) дифференцируются в один из следующих подтипов, в зависимости от микроокружения Т-клеток: Th1, Th2, Th17 или Tregs. Каждая популяция характеризуется секрецией ряда цитокинов, функция которых необходима для устранения повреждающего агента в организме, устранения воспаления и поддержания иммунного гомеостаза. ММСК модулируют дифференциацию, функцию и баланс этих субпопуляций и способствуют развитию противовоспалительного иммунного ответа. Активация Т-лимфоцитов (CD45RA +) в благоприятных условиях для индукции Th1 или Th2 и в присутствии ММСК приводит к ингибированию секреции IFN γ клетками Th1 и увеличению секреции IL-4 клетками Th2. Кроме того, ММСК ингибируют продуцирование провоспалительных цитокинов IL-17, IL-22, IFN γ и TNF α и

дифференцировку лимфоцитов CD4 + на Th17. В то же время, ММСК способствуют секреции IL10 [89].

Взаимодействие ММСК с дендритными клетками (ДК).

ДК являются наиболее важными антигенпрезентирующими клетками в организме. Основная функция ДК - обрабатывать и представлять антигены Т-клеткам памяти, хотя они также взаимодействуют с другими иммунными компонентами, такими как В-лимфоциты и NK-клетки. Отдельные ДК должны созревать, чтобы инициировать соответствующий иммунный ответ, и во время процесса созревания ДК увеличивают экспрессию мембранных МНС-II и Т-клеточных костимуляторных молекул CD80 и CD86. ММСК могут влиять на вид, созревание и функционирование ДК. ММСК могут значительно уменьшить дифференцировку моноцитов в ДК, влияя на повышение активности CD1a, CD40, CD80, CD86 и HLA-DR. Это уменьшение осуществляется посредством секреции факторов и является обратимым процессом, поскольку эти моноциты затем дифференцируются обычно при удалении ММСК. Кроме того, ММСК влияют на секрецию нескольких цитокинов, которые являются ключевыми для созревания ДК. Есть данные, что ММСК блокируют секрецию TNF α с помощью ДК, активированных LPS. Ингибирование секреции TNF α ДК ингибирует их созревание, миграцию в лимфатические узлы и их способность стимулировать Т-лимфоциты из-за изменения в экспрессии нескольких рецепторов, которые необходимы для захвата и обработки антигенов. ММСК также ингибируют секрецию ДК IL-12.

Взаимодействие ММСК с NK-клетками.

NK-клетки играют важную роль в врожденном иммунитете и участвуют в защите организма от инфекционных и онкологических процессов. NK-клетки выполняют свою функцию посредством секреции цитокинов, таких как IFN γ , TNF β и GM-CSF, и обладают цитотоксической активностью как спонтанной, так и антителозависимой. Функция NK регулируется равновесием сигналов, передаваемых активаторами и рецепторами-ингибиторами, которые взаимодействуют с определенными молекулами HLA на клетках-мишенях. Таким

образом, HLA-класс I отрицательный или HLA-класс I-несогласованные клетки представляют собой потенциальные мишени NK-клеток. ММСК влияют на фенотип, пролиферацию, цитотоксический потенциал и секрецию цитокинов NK-клеток. Когда активирован IL-2, NK-клетки секретируют IFN γ , но при активации в присутствии ММСК секреция IFN γ значительно снижается. Кроме того, NK-клетки, активированные IL-2 и антигенами в присутствии ММСК, проявляют уменьшенную пролиферацию и литическую активность. IL-15 представляет собой другой цитокин, который способствует пролиферации, выживаемости и цитотоксической функции NK-клеток, но через секрецию факторов ММСК могут ингибировать пролиферацию, индуцированную IL-15 [89].

Взаимодействие ММСК с В-лимфоцитами.

В-лимфоциты участвуют в адаптивном иммунном ответе. Эти клетки ответственны за гуморальный иммунитет и специализируются на синтезе антител. Немногие исследования проанализировали влияние ММСК на В-лимфоциты; однако ММСК уменьшают пролиферацию В-клеток путем остановки клеточного цикла в фазе G0 / G1, а не путем индуцирования апоптоза. ММСК могут также влиять на дифференцировку В-клеток, поэтому синтез IgM, IgG и IgA уменьшается. Кроме того, ММСК модифицируют хемотаксические свойства В-лимфоцитов, поскольку экспрессия их хемокиновых рецепторов, включая CXCR4, CXCR5 и CCR7, индуцируется ММСК.

ММСК имеют способность мигрировать в ткани из кровеносного русла, в ответ на сигналы, которые возникают в условиях травм. Механизмы, с помощью которых ММСК привлекаются в ткани и пересекают слой эндотелиальных клеток, обусловлены участием хемокинов и их рецепторов, поскольку они являются важными факторами, которые, как известно, контролируют миграцию клеток. Сообщается, что хемокины участвуют в миграции других типов клеток-предшественников; CXCL12 (stromal cell-derived factor-1) и его рецептор CXCR4 имеют решающее значение для вовлечения в миграцию в зону повреждения [132, 179].

Плацента как источник ММСК

Плацента человека представляет собой орган, состоящий из плодной и материнской части. В нескольких работах описано присутствие ММСК в плаценте; обнаружено, что ММСК из некоторых образцов имели не только плодное, но и материнское происхождения. Логичным объяснением наличия материнских клеток в этой популяции является наличие клеток, попавших из децидуальной оболочке.

Обнаружено, что пролиферативный потенциал ММСК, полученных из плодной части плаценты значительно выше, чем у ММСК, полученных из костного мозга [87, 181, 64, 72, 80]. Известно, что при удалении 2/3 печени у крыс на 13-й день беременности, через 7 дней после операции (20 день беременности) печень плодов этих крыс по абсолютному и относительному весу в среднем на 14% больше, чем у плодов от крыс, которым производили ложную операцию [48, 71, 174].

Костный мозг взрослых является общеизвестным источником ММСК, используемым в клинических условиях. Однако использование костного мозга имеет некоторые ограничения. Во-первых, количество ММСК в костном мозге относительно меньше, чем в других источниках. Кроме того, забор костного мозга у пациента является инвазивной процедурой. Поэтому поиск альтернативных источников ММСК, полезных для клинического применения, важен. Ранее было обнаружено, что амниотическая жидкость второго триместра является обильным источником ММСК. Однако риск амниоцентеза исключает использование амниотической жидкости для обычного клинического применения. Еще одним источником ММСК является жировая ткань. В отличие от костного мозга этот источник более доступен для получения. Содержание ММСК в жировой ткани не уступает их количеству в костном мозге [140, 92]. Однако получение липоасpirата также является инвазивной процедурой с возможностью осложнений. Исходя из этих данных, становится понятно, что плацента является приоритетным источником ММСК. Присутствие ММСК в плаценте предполагает

роль этих клеток в индукции иммунологической толерантности к плоду. Плацента во втором, и что особенно ценно в третьем триместре представляет собой богатый источник ММСК [86, 69, 159, 70, 85, 129].

Особенности регенерации печени

Регенерация печени при повреждении

Регенерацией тканей называется эволюционно выработанный процесс обеспечивающий ее обновление в ходе нормальной жизнедеятельности (*физиологическая регенерация*) или восстановление после повреждения (*репаративная регенерация*). Репаративная регенерация осуществляется на основе тех же механизмов, что и физиологическая, но отличается от нее большей интенсивностью проявлений. [1, 5, 25, 54, 57, 60, 42]. Регенерация печени при повреждении представляет собой процесс регенерационной гипертрофии. В печени участок некроза подвергается рубцеванию, а в остальной части органа происходит интенсивное новообразование клеток, а также гиперплазия внутриклеточных структур, что сопровождается их гипертрофией. В результате этого исходная масса и функция органа быстро восстанавливаются [47, 56]. Потеря массы печени может быть вызвана действием токсических веществ, которые приводят к воспалительному ответу, индуцирующему активацию регенерации [105]. Ещё одним из путей потери массы печени является выполнение хирургического вмешательства, которое способствует удалению 2/3 массы печени. Этот метод известен как частичная гепатэктомия, которая также используется у людей для удаления одиночных метастазов в печени [111, 150]. Частичная гепатэктомия является наиболее часто используемой процедурой для анализа процессов регенерации печени в экспериментальных моделях [152].

Процесс регенерации печени включает множественные клеточные и внутриклеточные изменения обусловленные взаимодействием клеток с цитокинами и факторами роста [149, 131, 164]. Влияние цитокиновой системы во

время инициации регенерации печени включает изменение уровня фактора некроза опухоли (TNF), интерлейкина-6 (IL-6) после частичной гепатэктомии [147], активацию ядерного фактора-каппа В (NF-κB), сигнального белка и активатора транскрипции 3 (STAT3). Система цитокинов иницируется посредством связывания TNF с TNF-рецептором I типа (TNFR1), продуцировании IL-6 и активации STAT3 в гепатоцитах. Взаимодействие фактора некроза опухолей с мембранным рецептором TNFR1 приводит к активации NF-κB в непаренхиматозных клетках (NPC), таких как клетки Купфера. Ещё одним из факторов, который может вызвать активацию цитокиновой системы, является молекула липополисахарида (LPS), которая выделяется кишечной микрофлорой и всасывается в портальный кровоток. [55].

Действие системы цитокинов является пусковым звеном в регенерации печени, способствующим переходу гепатоцитов от фазы G0 клеточного цикла к фазе G1 [30]. Дальнейшее изменение клеточного цикла стимулируют факторы роста, такие как фактор роста гепатоцитов (HGF) и эпидермальный фактор роста (EGF) [26]. HGF продуцируется звездчатыми клетками, и его эффекты в организме являются множественными, от активации митоза до действия на структуру гепатоцита [126]. Стимуляция рецепторов HGF (HGFR), EGF (EGFR), и воздействие трансформирующего фактора роста (TGF), гепарин-связывающего эпидермального фактора роста (HB-EGF) и амфирегулина (AR) активирует многочисленные внутриклеточные сигнальные пути в гепатоцитах. Они, в свою очередь, регулируют процессы транскрипции, обеспечивающие течение клеточного цикла с конца фазы G1 до фазы S [183, 101, 154]. Совместное действие цитокинов и факторов роста активирует механизмы, необходимые для выживания, роста и пролиферации гепатоцитов после частичной гепатэктомии или другого повреждения [147, 106, 189]. В процессе регенерации происходит увеличение размера гепатоцитов и долей печени [104].

Взаимодействие между цитокинами и фактором роста было продемонстрировано на рисунке 1.1.

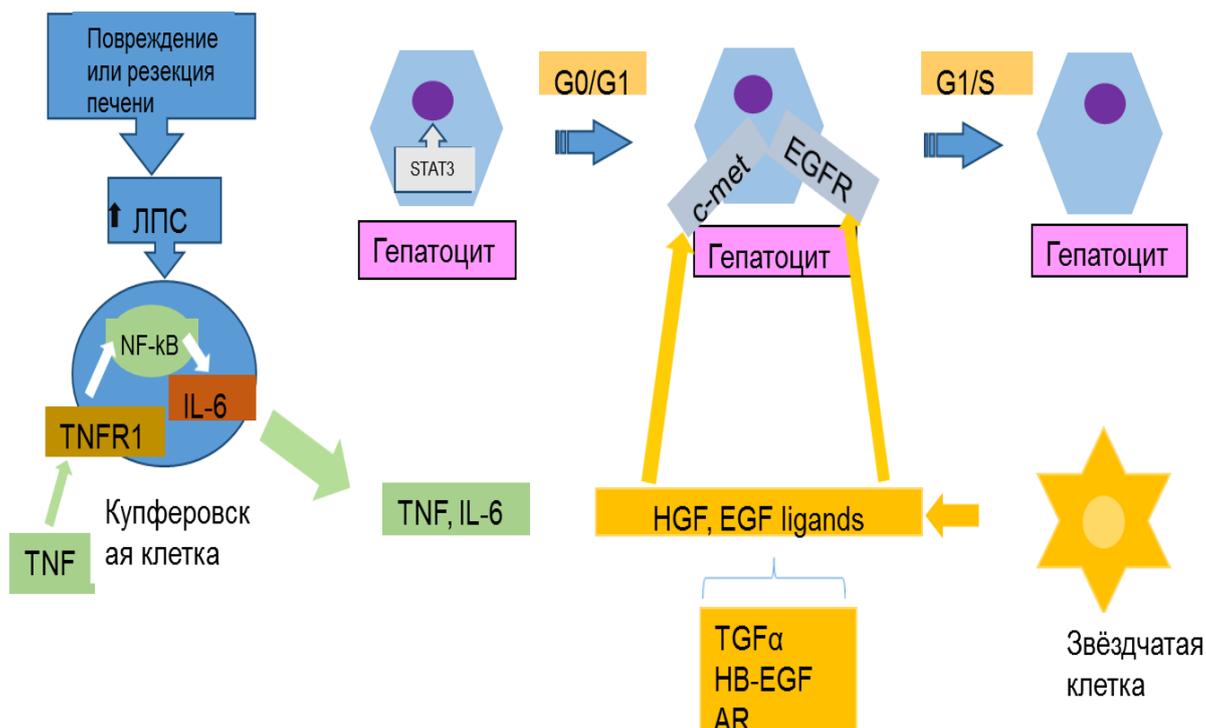


Рисунок 1.1. Цитокины и факторы роста участвующие в регенерации печени (*Taub R, 2004 and Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ, 2006 illustrations*). ЛПС - липополисахарид; TNF – фактор некроза опухоли; TNFR1 – рецептор 1 типа к фактору некроза опухоли; NF-kB – ядерный фактор-kB; IL-6 – интерлейкин 6; STAT3 - сигнальный белок и активатор транскрипции 3; HGF – фактор роста гептоцитов; c-met – рецептор к фактору роста гепатоцитов; EGF – эпидермальный фактор роста; TGF α - трансформирующий фактор роста α ; HB-EGF - Гепарин-связывающий белок, участвующий в процессе стимуляции деления клеток эпителиального покрова с помощью эпидермального фактора роста; AR - амфирегулин; EGFR- рецептор лигандов эпидермального фактора роста.

Роль Купферовских клеток в регенерации печени

Печень содержит большое количество (до 15 % всех клеток органа) резидентных макрофагов и является иммунореактивным органом. Клетки Купфера, или звездчатые макрофаги, находятся в синусоидах и образуют часть выстилки капилляров. Они имеют многоотростчатую, неправильную форму и вытянутые или округлые ядра. Макрофаги являются производными моноцитов и мигрируют в ткани из периферической крови. Хотя клетки Купфера и относятся к популяции резидентных макрофагов, у них есть способность мигрировать вдоль синусоидов к регионарным лимфоузлам и к месту повреждения [10].

Купферовские клетки являются антиген-презентирующими клетками и могут активировать специфические эффекторные Т- и В-лимфоциты. Основная функция макрофагов заключается в очищении портальной крови от чужеродных, токсических веществ, иммунных комплексов, бактерий, эндотоксинов, активированных факторов свертывания крови и продуктов деградации фибрина и т.д. Основная выполняемая ими защитная функция способствует их сосредоточению большей частью на периферии печеночных долек [4, 39].

Купферовские клетки способны синтезировать и секретировать цитокины, влияющие на регенерацию печени. Синтезируемые макрофагами TNF- α и IL-6 оказывают существенное влияние на пролиферацию гепатоцитов и холангиоцитов. Предполагается, что активация этих цитокинов в ответ на частичную гепатэктомию обусловлена стимуляцией макрофагов печени бактериальными продуктами кишечного происхождения. Кроме того, было показано, что моноцитарный хемотоксический белок-1 (MCP-1), молекула межклеточной адгезии 1 (ICAM-1) являются факторами, способствующими миграции циркулирующих макрофагов в печень после частичной гепатэктомии [131].

Макрофагами наряду с клетками Ито и эндотелиальными клетками синтезируют HGF, который является основным митогеном для гепатоцитов. В экспериментах с введением инкапсулированного в липосомы дихлорметиленисфосфоната (клодроната), у мышей после частичной гепатэктомии истощение макрофагов может значительно снизить скорость регенерации печени [15].

При совместном культивировании клеток Купфера с гепатоцитами, последними синтезируется белок ALR (augmenter of liver regeneration), являющийся важным регулятором пролиферации гепатоцитов. Предполагается, что стимулирующее влияние белка ALR на пролиферацию гепатоцитов осуществляется опосредованно через стимуляцию синтеза TNF- α и IL-6 активированными купферовскими макрофагами [131].

В то же время, некоторые ученые считают, что активация клеток Купфера и синтез ими биологически активных веществ может вызывать повреждение клеток печени и способствовать развитию фиброза. Так активные формы кислорода, выделяемые купферовскими клетками в качестве защиты от бактериальной инвазии способны окислять липиды в мембранах гепатоцитов. Оксид азота при его взаимодействии с активными формами кислорода, образует пероксинитрит, который увеличивает окислительный стресс клеток при ишемии печени [15]. Синтезируемый звездчатыми клетками TNF- α способен инициировать апоптоз гепатоцитов за счет активации TNFR 1 [23].

Таким образом, Купферовские клетки выполняют не только иммунную функцию, фагоцитируя патогены, но и влияют на репаративную регенерацию органа, как способствуя активации митогенов, так и напрямую стимулируя пролиферацию гепатоцитов.

Изменения регенерации печени при старении

Морфологические особенности

Печень является относительно медленно стареющим органом. Эта особенность обусловлена морфофункциональной полноценностью гепатоцитов и сохранностью внутрипеченочной иммунной системы, регистрирующихся в течение длительного периода жизни. Печень человека претерпевает ряд структурных изменений начиная со зрелого возраста. Часть данных изменений носит компенсаторно-приспособительный характер и обеспечивает в процессе старения удовлетворительное функционирование органа [154]. После 50 лет отмечено уменьшение массы печени (до 600 г), что коррелирует с соотношением массы печени и тела человека [21]. В дальнейшем, в связи с развитием возрастных изменений, после 70 лет орган уменьшается ещё на 150-200 г. Атрофия печени отмечающаяся лишь к 8-му десятилетию, значительно варьирует, но не достигает критической степени выраженности даже у долгожителей [22].

Отмечено уменьшение общего числа гепатоцитов начиная с 45-50 лет (приблизительно на 6 клеток в поле зрения), а в старческом возрасте (75-89 лет) – ещё на 3-4 клетки, у долгожителей (старше 90 лет) – на 5 клеток. У лиц 60-89 лет гепатоциты преимущественно нормальной величины, но при этом определяются печеночные клетки большего и меньшего размера. У людей старше 90 лет преобладают гепатоциты меньшего размера; значительно уменьшается число гипертрофированных клеток за счет снижения площади цитоплазмы и ядер гепатоцитов, что является результатом развития компенсаторных процессов. В гистологическом препарате печени отмечается увеличение количества крупных двуядерных гепатоцитов (регенераторного типа). При исследовании гепатобиоптата отмечается возрастание изменений в ядрах, хромосомные aberrации.

Вместе с этим в старческом возрасте зарегистрировано увеличение количества, размер лизосом и повышение или снижение активности лизосомальных ферментов. Повышается число вторичных лизосом, меняются размеры митохондрий. Также обнаружено усиленное включение липофусцина в гепатоцитах центральных долек с тенденцией их к атрофии [13]. Выявлено, что гипертрофированные клетки содержат большее количество ДНК и белка, в том числе альбумин.

Отмечается снижение печеночного кровотока у людей пожилого и старческого возраста на 30-50%. В связи с развитием атеросклероза брыжеечной артерии и снижением сердечного выброса при доплеровском ультразвуковом исследовании выявлено уменьшение скоростных показателей тока крови [13].

При морфологическом исследовании в гистологических препаратах печени у пожилых выявляются характерные черты нормальных инволютивных процессов, такие как расширение синусоидов в периферической зоне, увеличение диаметра центральной вены, выраженное венозное полнокровие фиброз стенок сосудов. Образуются прямые пути оттока крови в центральную вену от междольковых и септальных разветвлений воротной вены. Особенно

утолщены стенки артерии, меньше вен и желчных протоков. Прослойки соединительной ткани около триад склерозированы [98].

По данным литературы в экспериментальных исследованиях на старых крысах, при проведении иммуногистохимических исследований и сканирующей электронной микроскопии, выявлены псевдокапилляризация, дефенестрация, утолщение синусоидального эндотелия. Перисинусоидальная экспрессия фактора Виллебранда, коллагена I и IV типов, нарушение транспорта хиломикрон способствует накоплению коллагена в пространстве Диссе [83, 185].

Обозначенные структурные изменения приводят к затруднению транспорта субстратов и кислорода, что способствует развитию гипоксии клеток печени, повреждению ДНК и развитию мутаций.

Функциональные особенности при старении

Для адекватной оценки результатов лабораторных исследований необходимо учитывать различные факторы, такие как возраст (развитие инволютивных изменений), качество жизни, характер питания, прием медикаментов [44].

С возрастом функциональное состояние печени меняется, что отражается на показателях биохимических тестов. В связи со снижением синтетической функции печени отмечается уменьшение на 10-20% содержания альбумина, а-липопротеидов, активности псевдохолинэстеразы. В результате накопления атипических белковых фракций – парапротеинов и сывороточных антител повышается уровень глобулинов. С возрастом отмечается накопление ферментов: НАДФ-редуктазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, цитохрома С, супероксиддисмутаза, катепсина D [110].

Отмечается повышение активности щелочной фосфатазы и повышение содержания билирубина и увеличение конъюгированного билирубина в связи со снижением экскреторной функции печени.

Для старческого возраста характерно повышение свободного холестерина. Гиперхолестеринемия пожилых обусловлена, в том числе, нарушением его метаболизма в печени.

При старении наблюдается замедление регенераторных процессов, скорости метаболизма ксенобиотиков, снижается чувствительность к глюкокортикоидам, инсулину [21, 108].

Роль старения в регенерации печени

Клинически значимым возрастным изменением печени является заметное снижение скорости её регенерации [172]. Значимость нарушений регенерации печени у пожилых людей заключается в заметном увеличении смертности от болезней печени, например, гепатоцеллюлярной карциномы, или от повреждения печени лекарствами у пожилых людей по сравнению с более молодыми пациентами [118]. *Regev A., Schiff E.* (2001) сообщили о 3-5-кратном увеличении смертности от болезней печени в возрасте старше 65 лет по сравнению с возрастом до 45 лет [170]. Частичная гепатэктомия широко используется для удаления опухолевых клеток у пожилых пациентов [118]. Тем не менее, *Schmucker D. L., Sanchez H.* (2011) [172] в обзоре показали, что меньшее количество гепатоцитов у стареющих животных и пожилых людей входит в S-фазу, с окончанием клеточного цикла после частичной гепатэктомии. *Sawada H.* (1989) [171] продемонстрировал, что пролиферативный ответ гепатоцитов на эпидермальный фактор роста заметно снижается у старых животных, что свидетельствует о том, что при старении снижается чувствительность клеток у старых крыс к факторам роста. Далее *Marti U.* (1993) [137] продемонстрировал в плазматических мембранах гепатоцитов, выделенных из интактной печени, что в 60% случаев снижение связывания эпидермального фактора роста с мембранами гепатоцитов (через EGFR) у крыс связано с возрастом. С другой стороны, *Ishigami A., Reed T.D., Roth G.S.* (1993) [123] сообщили об отсутствии каких-либо возрастных изменений в способности связывания эпидермального фактора роста в

первичных культурах гепатоцитов, но сообщали о заметном снижении EGF-индуцированного синтеза ДНК. Несмотря на различия в результатах, все исследования показывают, что задержка регенерации печени у пожилых связана с факторами роста, в основном с эпидермальным фактором роста [158].

Альтернативные пути решения проблемы дефицита донорских органов

Процедура трансплантации печени имеет несколько ограничений, в том числе недостаток доноров, осложнения при хирургическом вмешательстве, иммунологические осложнения и высокие медицинские расходы [127]. Альтернативные подходы, которые не требуют использования целого органа, такие как трансплантация стволовых клеток, были предложены в качестве эффективной альтернативной терапии при заболеваниях печени [136, 176, 90, 178, 191, 173, 177, 146, 161]. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, являются самообновляющимися клетками, которые можно найти практически во всех постнатальных органах и тканях, включая печень. За последнее десятилетие был достигнут большой прогресс в области ММСК-зависимой регенерации печени [117, 156, 141, 66, 142, 59, 190, 125, 175, 75, 77].

Из-за их способности к выработке биологически активных веществ, а также из-за их иммуномодулирующих характеристик, введение ММСК считается перспективным терапевтическим решением для терапии острой печеночной недостаточности [74, 157, 67, 91, 102, 169, 76, 139, 107].

Экспериментальные модели острой печеночной недостаточности

Хирургические модели на животных

Данные о первой попытке создания хирургической модели ОПН датируются 1886 годом, когда О. Minkowski et al. выполнил тотальную гепатэктомию у гуся, с последующим появлением у птицы судорог и развитием комы. Следующие документальные данные представлены F.C. Mann et al.,

который в 1921 г. описал развернутую клиническую картину ОПН после резекции печени у собак. В 1893 году М. Hahn et al., совершенствуя технику создания новой модели ОПН, провел опыт создания portoкавального анастомоза для прохождения крови без участия печени. Тем не менее, после проведения такой операции ухудшалась специфическая функция печени без появления симптомов ОПН (тяжелая энцефалопатия вплоть до развития комы, нарушение коагуляционного гемостаза, повышение печеночных ферментов и прочее). Далее были попытки формирования печеночного анастомоза в сочетании с лигированием портальной вены и печеночной артерии с развитием у животных комы и их гибели в течении 10 часов. В настоящее время хирургические модели условно подразделяются на 3 группы.

1. модели с резекцией печени и гепатэктомией,
2. модели с полной и частичной деваскуляризацией печени,
3. модели, сочетающие в себе резекцию и печени и деваскуляризацию.

После проведения гепатэктомии (операция по удалению всего объема печени) животное погибает примерно через 15-26 часов на фоне развития выраженной энцефалопатии в состоянии комы. F. C. Mann et al. впервые в 1921 году описал моделирование ОПН посредством проведения гепатэктомии у собак. Техника выполнения этого оперативного вмешательства была длительной, состояла из нескольких этапов, что приводило к внушительной хирургической травме, которая сама, скорее всего и приводила к развитию ОПН. Вследствие этого в дальнейшем F. Filipponi et al. в 1999 г была создана и описана одноэтапная, гораздо менее травматичная модель. Массивное механическое повреждение в результате хирургической травмы является клиническим эквивалентом гепатэктомии. Положительными чертами этой модели являются относительно несложная воспроизводимость и возможность исследования аппаратов «искусственной печени» в условиях отсутствия токсинов, выделяемых пораженной печенью. Тем не менее, подобная модель имеет свои недостатки вследствие необратимости. Более того, после гепатэктомии в крови отсутствуют необходимые токсические вещества и воспалительные факторы для развития

ОПН. Современная модель ОПН на основе гепатэктомии выполняется одноэтапно с формированием Y-образного анастомоза между воротной, внутрибрюшным и внутригрудным отделом полой вены. Подобная модель способствует выполнению гепатэктомии с минимальной кровопотерей и без выполнения экстракорпорального шунтирования [53].

Наиболее известной и широко распространенной моделью, которая используется по сей день, является модель, предложенная G.M. Higgins и R.M. Anderson в 1931. Они выполнили и описали процесс резекции 70% печени и ее последующей регенерации. Были выполнены модели с другим объемом резекции. Удаление от 2-10% и до 30% объема ткани печени, вызывает минимальную реакцию, с медленно протекающей регенерацией. При удалении более 85% органа наблюдается высокая летальность. Например, при резекции печени у крыс в объеме 90% без терапии все животные погибают в течении 48 часов [100]. В 2014 году был выполнен и документально описан Claudia Mitchell & Holger Willenbring легко воспроизводимый и хорошо переносимый метод частичной 2/3 гепатэктомии у мышей, основанный на модели G.M. Higgins и R.M. Anderson. Его преимущества заключается в простоте хирургической техники, которая занимает 15-20 минут, и отсутствии летальности при правильном выполнении.

Модели с полной или частичной деваскуляризацией печени, так же как и модели сочетающие резекцию печени и деваскуляризацию являются трудоемкими. Для их реализации наиболее подходит использование крупных животных, что обременительно по этическим и экономическим аспектам, в то время как для экспериментов на мелких животных необходимо использование специального оборудования и микрохирургической техники.

Химические модели на животных

При действии большинства гепатотоксических химических веществ происходит мозаичное повреждение печени с некротизацией центральных или периферических зон долек. В случае моделирования ОПН, возможно потребуются

неоднократное введение токсических веществ [18, 19, 20]. После повреждения, печень, в большинстве случаев, регенерирует до исходной структуры с нормальным количеством долек. Однако, при более длительном воздействии гепатотоксических веществ после регенерации развивается цирроз с нарушением архитектоники печени. Наиболее распространенные химические модели формируются при введении: четыреххлористого углерода (CCl_4); ацетаминофена; D-галактозамина; тиоацетамида (ТАА); азоксиметана и конканавалина А [135].

Токсичность четыреххлористого углерода была подробно изучена при проведении экспериментов на различных животных, при разных путях введения. Можно использовать CCl_4 для формирования моделей острой и хронической печеночной недостаточности, применяя разные дозировки препарата и продолжительность воздействия. При воздействии CCl_4 на печень развивается некроз гепатоцитов центральной и части промежуточной зон долек всей печени, что приблизительно равно 40-50 % объема органа. Рассмотрено, что регенерация происходит за счет оставшихся неповрежденным делящимся и мигрирующим на место погибших клеток гепатоцитам средних и периферических зон. В течение нескольких дней дефекты ткани полностью замещаются. Возможно моделирование хронической печеночной недостаточности с формированием соединительнотканых перегородок между дольками. Формируются ложные дольки. В зависимости от дозы, времени воздействия, наличия потенцирующих агентов или возраста пораженного организма, регенерация возможна с полным восстановлением печени. CCl_4 активируется цитохромом (СУР) 2E1, СУР2B1 или СУР2B2 и, возможно, СУР3A, с образованием трихлорметильного радикала CCl_3^* . Этот радикал может связываться с клеточными молекулами (нуклеиновая кислота, белок, липид), нарушая важнейшие клеточные процессы, такие как липидный обмен, с потенциальным исходом жировой дегенерации (стеатоз). Считается, что образование связи между CCl_3^* и ДНК является инициатором рака печени. Этот радикал также может реагировать с кислородом с образованием трихлорметилперокси-радикала CCl_3OO^* , высокореактивного вида. CCl_3OO^* инициирует цепную реакцию перекисного окисления липидов, которая

воздействует на полиненасыщенные жирные кислоты с их разрушением, в частности на те, которые связаны с фосфолипидами. Это влияет на проницаемость митохондриального, эндоплазматического ретикулума и плазматических мембран, что приводит к потере клеточного связывания кальция и гомеостаза, что может в значительной степени способствовать последующему повреждению клеток. Среди продуктов распада жирных кислот являются реакционноспособные альдегиды, особенно 4-гидроксиноненальные, которые легко связываются с функциональными группами белков и ингибируют важные функции ферментов. Интоксикация CCl_4 также приводит к гипометилированию клеточных компонентов; в случае РНК считается, что исходом является ингибированием синтеза белка, в случае фосфолипидов он играет роль в ингибировании секреции липопротеинов. Ни один из этих процессов сам по себе не считается основной причиной смерти клеток, вызванной CCl_4 ; именно благодаря совместному протеканию они достигают смертельного исхода, при условии, что токсикант действует в высокой разовой дозе или в течение более длительных периодов времени при низких дозах. На молекулярном уровне CCl_4 активирует фактор некроза опухолей (TNF) альфа, оксид азота (NO) и трансформирующие факторы роста (TGF) -альфа и -бета в клетке, процессы, которые, по-видимому, направляют клетку главным образом на (само-) разрушение или фиброз. TNF α способствует апоптозу, тогда как TGF фиброзу. Интерлейкин (IL) -6, хотя и индуцированный TNF α , обладает явно антиапоптотическим эффектом, а IL-10 также противодействует TNF α . Таким образом, оба интерлейкина могут инициировать восстановление поврежденного CCl_4 гепатоцита. Химические вещества, которые индуцируют цитохромы, которые метаболизируют CCl_4 , или замедляют регенерацию ткани при совместном введении с CCl_4 , будут сильно влиять на ее токсичность, в то время как соответствующие ингибиторы CYP450 уменьшают значительную часть токсичности. Парциальное давление кислорода также может изменять степень гепатотоксичности CCl_4 . Давление между 5 и 35 мм рт. ст. способствует перекисному окислению липидов, тогда как отсутствие кислорода, а также парциальное давление выше 100 мм рт. ст., полностью

предотвращают перекисное окисление липидов. Следовательно, место повреждения, вызванного CCl_4 , отражает градиент кислорода в дольке печени [96, 97, 115, 162].

Ацетаминофен (парацетамол) – широко распространённое нестероидное противовоспалительное средство, вызывающее повреждение печени, при употреблении его в высоких дозировках (6 и более грамм в сутки у взрослых). Механизм гепатотоксичного действия парацетамола связан с особенностями его метаболизма. Около 97% парацетамола метаболизируется в печени. Большая его доля (80%) вступает в реакцию конъюгации с глюкуроновой кислотой и сульфатами, с образованием неактивных метаболитов — глюкоронида и сульфата парацетамола. Меньшая доля ацетаминофена подвергается окислению изоферментами цитохрома P450 — 2E1 и 1A2 с образованием N-ацетил-p-бензохинонимина (NAPQI), который при конъюгации с глутатионом превращается в нетоксичный конъюгат меркаптуровой кислоты и выводится с почками. При недостатке глутатиона значительно увеличивается концентрация N-ацетил-p бензохинонимина (NAPQI), который связывается с клеточными белками, в результате чего образуются ацетаминофен белковые аддукты (соединения) (APAP-Cys) [43, 186, 84].

Данная модель является трудновоспроизводимой вследствие различного проявления токсического эффекта препарата у животных разного вида и возраста. Для воссоздания модели требуется формирование сложных схем введения и регулярный контроль уровней ацетаминофена и метгемоглобина в крови. Соответственно для мелких животных данный контроль ограничен из-за малого объема циркулирующей крови. Использование этой модели актуально для оценки эффективности клеточной терапии при ОПН у людей.

D-галактозамин – молекула, вызывающая различные биохимические изменения и некроз печени при метаболизации её через галактозный путь в печени. Есть данные, что использование D-галактозамина для повреждения печени применялось как у крупных, так и у мелких животных. Liehr H., Grun M., Seelig H.P. e. a. Virchows Arch. B. (1978) сообщают, что в патогенезе поражения

печени, вызываемого D-галактозамином, большую роль играет вызываемая им *in vitro* и *in vivo* дегрануляция тучных клеток, сопровождающаяся активацией системы комплемента циркулирующим эндотоксином. Все это приводит к гибели клеток. Обнаружены различия в чувствительности к данному препарату у разных видов. Более того, даже в пределах вида различается промежуток времени от начала введения препарата до гибели животного. Использование D-галактозамина опасно для исследователей и достаточно дорогостояще при масштабных экспериментах [93, 68, 99].

Описаны данные, что тиацетамид вызывает апоптоз гепатоцитов при действии в низких дозировках, увеличение дозы приводит к образованию свободных радикалов с развитием перекисного окисления липидов и центрлобулярным некрозам. ТАА применяется, в основном, для моделирования хронической печеночной недостаточности при длительном введении препарата у мышей и крыс. Клиническая картина у этих животных проявляется развитием энцефалопатии, метаболического ацидоза, повышением уровня печеночных трансаминаз, нарушением коагуляционного гемостаза, гистологически наблюдаются очаги центрлобулярного некроза [94, 187, 128].

При применении азоксиметана у мышей развивается сходная с человеком клиническая картина ОПН. Было продемонстрировано, что у мышей снижается двигательная активность, выявляется потеря выпрямительного и роговичного рефлексов, гипераммониемическая энцефалопатия, а также развивается спонтанная гипотермия, характерная для ОПН других видов, в том числе человека. Таким образом, применение азоксиметана способствует созданию модели подходящей для изучения церебральных осложнений ОПН [94].

Внутривенное введение 15 мг/кг конканавалина А вызывает повреждение печени и воспроизводит проявления ОПН, воздействуя на макрофаги, активированные CD4 + Т-клетками. При использовании данной модели показано, что важную роль в возникновении фульминантного гепатита играет супрессор цитокинового сигнала (SOCS1), соответственно индукция экспрессии SOCS1 может быть методом для терапии данного заболевания. Так показано, что при

развитии индуцированного конканавалином А гепатита важную роль играют цитокины: фактор некроза опухоли (ФНО)- α , ИЛ-2 и интерферон- γ , увеличивается содержание ИЛ-4 и ИЛ-10. Наряду с этим происходит активация клеточного звена иммунитета (Kato M. et al., 2001). Модель на основе этого препарат предназначена для оценки эффективности терапии ОПН иммунного генеза [168].

Заключение

На основе данных, приведенных в обзоре литературы, можно заключить, что клеточная терапия представляет собой новый подход к восстановлению функции поврежденной печени. Также в настоящее время актуальным вопросом является получение и изучение стволовых клеток из источников, позволяющих получить достаточное их количество для эффективной терапии с минимальным риском возникновения осложнений. В таком случае является целесообразным рассмотреть плаценту, как источник стволовых клеток. Исследования, проведенные в последние годы, свидетельствуют о возможности выделения из ткани зрелой плаценты мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток ММСК, обладая способностью к выделению цитокинов с выраженными противовоспалительными, антиапоптотическими, регенеративными свойствами способны обеспечить активацию регенерации печени в условиях её повреждения.

С возрастом процессы регенерации начинают протекать на ином, отличном от зрелого организма уровне. При старении развивается прогрессирующее снижение количества и качества стволовых клеток. Использование заместительной клеточной терапии могло бы способствовать восстановлению регенерации тканей в старом организме. В литературе отсутствуют работы, описывающие использование плацентарных ММСК для активации регенерации печени зрелых и старых организмов в физиологических условиях, а также в условиях повреждающего воздействия.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Общая характеристика лабораторных животных

Эксперименты проведены на 262 аутбредных белых мышах. Зрелые мыши самцы в возрасте 7-8 мес., массой 28-30 г. Старые мыши самцы 16-17 мес., массой 34-36 г. ММСК выделены из хориона плаценты мышей-самок в возрасте 3-4 мес., массой 27-29 г. Оценка хоуминга проводилась на 20 белых лабораторных крысах-самцах возраста 6-8 мес., массой 200-220 г.

Животные содержались на стандартном рационе питания в условиях лабораторного вивария при температуре +18°C, определенных в Приказе Минздрава России №199 н от 01.04.2016 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики». Выполнении 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 «Уральский государственный медицинский университет» протокол № 2 от 16.02.2018.

Количество экспериментальных животных и распределение их по сериям экспериментов представлены в таблице № 2.1.

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 животных в каждой. Интактные животные – это животные, которые не подвергались экстремальным воздействиям (без субтотальной резекции печени и токсического гепатита). Беременные мыши-самки в количестве 10 особей. Регенераторные процессы в печени после её субтотальной резекции и моделирования токсического гепатита индуцировали путем внутривенного

введения через 1 час ММСК в количестве 4 млн. кл. /кг массы тела. Выведение из эксперимента производили на 1, 3 и 7 сутки.

Табл. 2.1. Группы животных, распределенные по сериям эксперимента.

Воздействие		Без субтотальной резекции печени и токсического гепатита			Субтотальная резекция печени			Токсический гепатит		
		условия	1 сутки	3 сутки	7 сутки	1 сутки	3 сутки	7 сутки	1 сутки	3 сутки
Зрелые мыши	NaCl	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	ММСК	7	7	7	7	7	7	7	7	7
Старые мыши	NaCl	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	ММСК	7	7	7	7	7	7	7	7	7

2.2. Экспериментальное планирование беременности

У лабораторных мышей был проведен анализ фаз эстрального цикла с целью определения фертильного периода. Для этого были получены влагалищные мазки лабораторных мышей. В эстральном цикле лабораторных мышей выделяется 4 фазы: проэструс, эструс, метаэструс, диэструс. Для каждой фазы характерна типичная цитологическая картина. В фазу проэструс влагалищный мазок состоит почти исключительно из эпителиальных клеток, расположенных поодиночке или небольшими группами, имеющих крупное ядро. Клетки, расположенные группами имеют многоугольную форму, а одиночные - овальную форму. В мазке отсутствуют лейкоциты. Влагалищный мазок в фазу эструс имеет вид чешуек, которые представляют из себя ороговевшие безъядерные клетки. В мазке отсутствуют эпителиальные клетки с ядрами и лейкоциты. Именно в фазу эструс самка мыши фертильна. В фазу метаэструс во влагалищном мазке содержится много лейкоцитов и незначительное количество ороговевших чешуек. Во влагалищном мазке фаза диэструс характеризуется наличием лейкоцитов, небольшим числом эпителиальных клеток с ядрами и большого количества слизи. В фазу эструс самку подсаживали к самцам в соотношении 1:3. На следующий

день у подсаженной самки были взяты мазки и, в том случае, если в мазке обнаруживались сперматозоиды (фазово-контрастная микроскопия), то данное лабораторное животное отсаживалось в отдельную клетку, и этот день условно принимался за первый день беременности.

Методика изготовления влагалищных мазков лабораторных мышей.

С помощью тупообрезанного и закругленного конца тонкой обструганной палочки с нанесенным небольшим слоем ваты, смоченным в воде, производится взятие мазка. После введения палочки во влагалище самки мыши, производится поворачивание круговым движением и извлечение. Мазок был изготовлен сразу после извлечения концом тампона в центре поверхности предметного стекла.

Окраска влагалищных мазков осуществлялась фиксатором-красителем типа Лейшмана. Изучение препарата проводилось с использованием микроскопа Micros MC 300 (x100, x400).

2.3. Выделение, культивирование и субкультивирование ММСК

Выделение культуры ММСК осуществлялось согласно модифицированному методу А.С. Тепляшина с соавторами (2004 г.).

Культивирование ММСК проводилось с целью получения достаточного количества однородной популяции ММСК. ММСК культивировались в условиях CO₂ – инкубатора (Termo Scientific) при температуре 37°C с содержанием углекислого газа 5% и влажностью 90 %. Через 24 часа инкубации нулевого пассажа не прикрепленные к пластику (флаконы) клетки смывали стерильным Dulbecco's phosphate buffered saline (StemCell Technologies, Канада) и добавляли специализированную среду для культивирования ММСК. Замена среды в объеме ½ от первоначальной производилась каждые 3 – 4 суток до достижения клетками 70 – 80 % конфлюэнтности. При формировании соответствующего монослоя осуществлялся пересев клеток. Для этого после удаления специализированной среды к клеткам был добавлен раствор аккутазы. Данный раствор позволяет разрушить межклеточные контакты и отделить клетки от дна флакона, не нарушая

при этом целостность мембраны клетки. В дальнейшем, клетки были суспендированы в специализированной среде для культивирования ММСК и подсчитаны в камере Горяева. Минимальное количество клеток, снимаемых после нулевого пассажа – $1,0 \times 10^4$ клеток/см². Таким образом, в первичной культуре выход смешанной популяции клеток, содержащей помимо ММСК также и гемопоэтические клетки, составляет 1 % от содержания клеток при нулевом пассаже. Первый, а в дальнейшем (после формирования 70 – 80 % монослоя) второй и третий пассажи клеток осуществлялись во флаконе в концентрации $1,0 \times 10^4$ клеток на 1 см². Для трансплантации лабораторным животным были использованы клетки третьего пассажа. Минимальное количество клеток, снимаемых после третьего пассажа – $2,0 \times 10^4$ клеток/см². 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 («StemCellTechnologies», Канада).

2.4. Идентификация ММСК

Полученные в культуре клетки типировались на соответствие ММСК путем их дифференцировки в остеогенном и адипоцитарном направлениях, иммуногистохимическим методом, иммунофенотипированием.

2.4.1. Дифференцировка в остеогенном направлении

Дифференцировка ММСК в остеогенном направлении включала следующую последовательность действий:

1. ММСК третьего пассажа были высеяны в 6 – камерные планшеты (площадь лунки 9,6 см²; «Nunc», Германия) в концентрации $1,0 \times 10^5$ клеток на

лунку в специализированную среду для культивирования ММСК (состав указан выше).

2. Культивирование продолжалось до достижения 70-80% конfluence.

3. Аспирация специализированной среды для культивирования ММСК и замена ее на раствор, индуцирующий дифференцировку ММСК в остеогенном направлении. Приготовление раствора, индуцирующего дифференцировку ММСК в остеогенном направлении: 10 мл среды, содержащей стимуляторы остеогенной дифференцировки - MesenCult™ Osteogenic Stimulatory Supplement («StemCell Technologies», Канада) добавляли к 40 мл основного раствора - MesenCult™ MSC Basal Medium (Mouse) («StemCell Technologies», Канада). К полученному раствору также было добавлено 0,5 мл (200 ммоль) раствора L-глутамина («StemCell Technologies», Канада). Таким образом, конечная концентрация L-глутамин составляла 2 ммоль.

4. Культивирование продолжалось в течение 2 недель с заменой среды каждые трое суток. Факт остеогенной дифференцировки подтвержден гистохимическим методом регистрации увеличения экспрессии щелочной фосфатазы, а также с помощью окраски von Kossa, выявляющей наличие минерализованного фосфата кальция.

Окраска на щелочную фосфатазу

Клетки трехкратно промывали 1xPBS и фиксировали 4%-ным раствором формальдегида (Sigma, США) в течение 1 ч при комнатной температуре. Фиксированные клетки промывали PBS три раза по 5 мин, после чего окрашивали на щелочную фосфатазу смесью BCIP-NBT (5-бром-4-хлор-индолил фосфат, тетразолевый синий) (Sigma, США) в течение 20-40 мин в темноте при комнатной температуре. Окрашенные препараты 3-4 раза промывали дистиллированной водой и высушивали. ММСК третьего пассажа, подвергнутые остеогенной дифференцировке (рисунок 2.1).

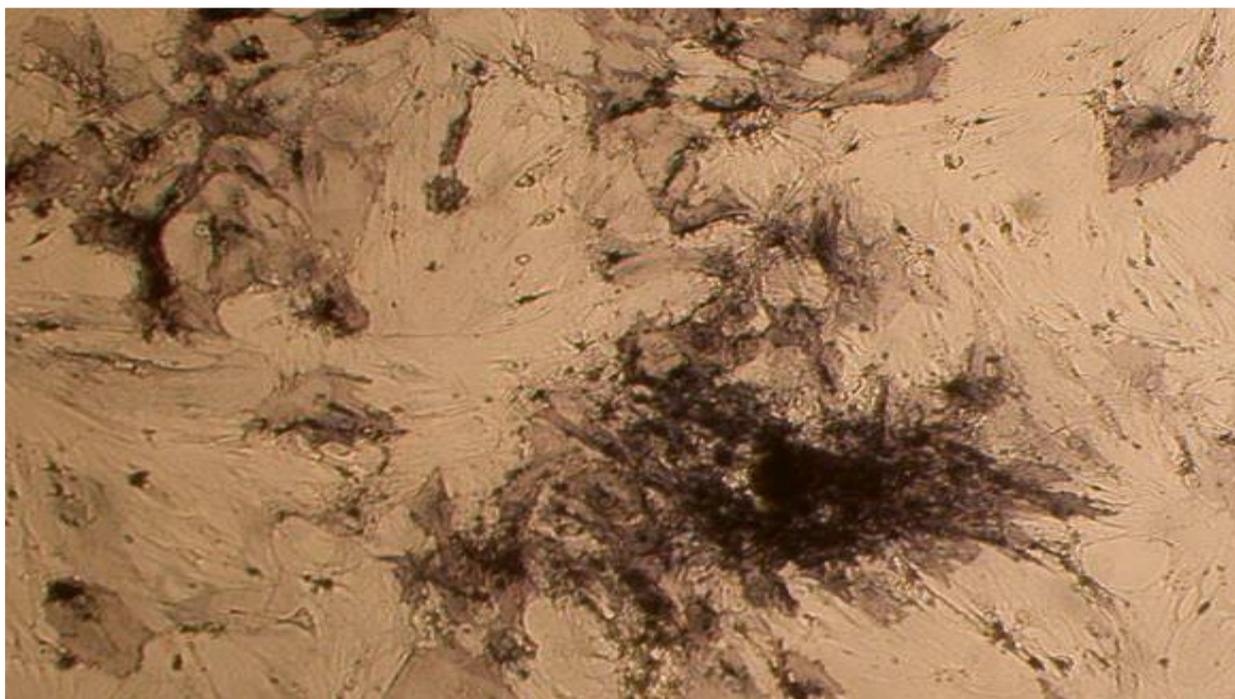


Рисунок 2.1. Окраска на щелочную фосфатазу. (ув. x 200).

Реакция von Kossa

ММСК фиксировали в метаноле 2 мин при температуре -20°C . В течение 1ч. проводили окраску 2%-ным раствором нитрата серебра (AgNO_3) (Вектон, Россия) под 60W лампой. Окрашенные клетки быстро промывали дистиллированной водой и на 5 мин помещали в 2,5%-ный раствор тиосульфата натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$). Окрашенные клетки повторно промывали дистиллированной водой и высушивали. Данная окраска позволяет выявлять нерастворимые соли кальция в межклеточном пространстве. Определяются нерастворимые соли кальция в культуре ММСК третьего пассажа, после остеогенной дифференцировки (рисунок 2.2).

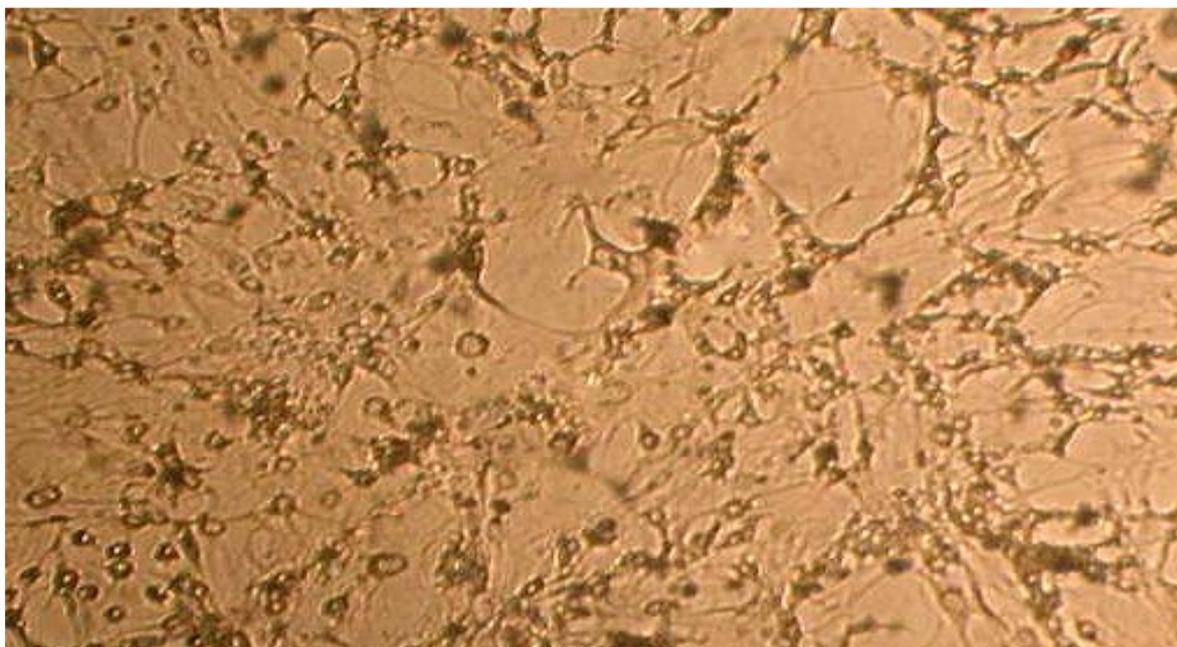


Рисунок 2.2. Реакция von Kossa (ув.х 200).

2.4.2. Дифференцировка в адипоцитарном направлении

Дифференцировка ММСК в адипоцитарном направлении включала следующую последовательность действий:

1. ММСК третьего пассажа были высеяны в 6 – камерные планшеты («Nunc», Германия) в концентрации $1 \cdot 10^5$ клеток на лунку в специализированную среду для культивирования ММСК (состав указан выше).

2. Культивирование продолжалось до достижения 70-80 % конfluence. 3. Аспирация специализированной среды для культивирования ММСК и замена ее на раствор, индуцирующий дифференцировку ММСК в адипоцитарном направлении. Приготовление раствора, индуцирующего дифференцировку ММСК в адипоцитарном направлении: 10 мл среды, содержащей стимуляторы адипоцитарной дифференцировки - MesenCult™ Adipogenic Stimulatory Supplement («StemCell Technologies», Канада) добавляли к 40 мл основного раствора - MesenCult™ MSC Basal Medium (Mouse) («StemCell Technologies», Канада). К полученному раствору также было добавлено 0,5 мл 200 ммоль раствора L-глутамин («StemCell Technologies», Канада). Таким образом, конечная концентрация L-глутамин составляла 2 ммоль.

4. Культивирование продолжалось в течение 2 недель с заменой среды каждые трое суток. Факт адипоцитарной дифференцировки подтвержден гистохимическим методом регистрации нейтральных липидных вакуолей, окрашивающихся красителем Oil Red O («Sigma», США).

Окраска жировым красным (Oil Red O)

1. Рабочий раствор Oil Red O приготовлен следующим образом: используя изопропанол был получен 0,5% раствор Oil Red O (Sigma, США) с последующим добавлением дистиллированной воды в соотношении 3:2.

2. Полученный раствор был профильтрован через фильтры 0,2 мкм.

3. Культура клеток была фиксирована в метаноле в течение 2 минут.

6. Фиксированные клетки промывали 50%-ным этанолом и окрашивали раствором жирового красного в течение 10 мин.

7. Окрашенные клетки промывали 50%-ным этанолом. ММСК третьего пассажа, подвергнутые адипоцитарной дифференцировке (рисунок 2.3).

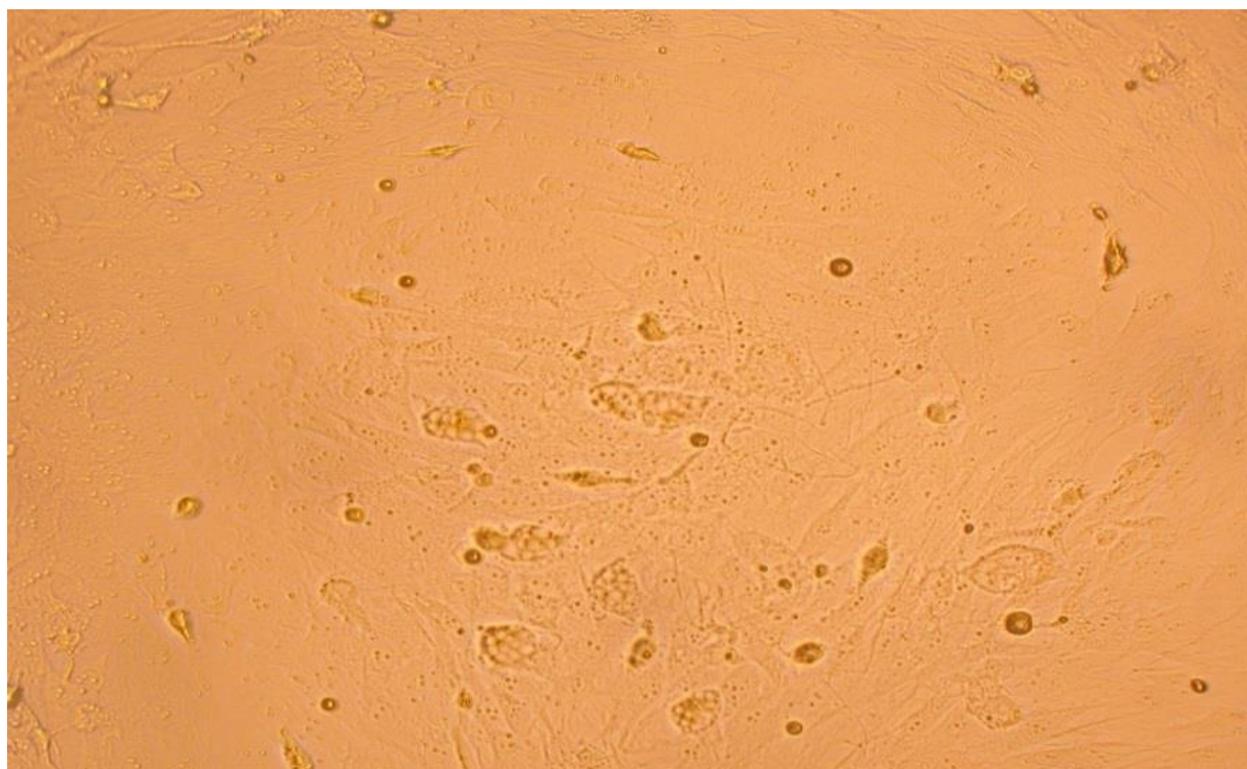


Рисунок 2.3. Окраска с использованием Oil Red O. (ув. x 200).

2.4.3. Идентификация ММСК иммуноцитохимическим методом

Идентификация ММСК иммуноцитохимическим методом проводилась с использованием набора - MILLIPORE®'s Mesenchymal Stem Cell Characterization Kit. MILLIPORE®'s Mesenchymal Stem Cell Characterization Kit содержит панель позитивных и негативных маркеров, характеризующих популяцию мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. Позитивные маркеры включают антитела, направленные против антигенов, расположенных на поверхности клеток – интегрин- $\beta 1$, CD 54, а также антитела к молекулам внеклеточного матрикса, формирующихся в культуре ММСК – фибронектину и коллагену I типа. К негативным маркерам для мезенхимальных стволовых клеток относятся специфичные антигены гемопоэтических клеток - CD 14 и CD45. Протокол действий по определению ММСК иммуноцитохимическим методом:

1. ММСК третьего пассажа были высеяны в 8 – камерные планшеты («Nunc», Германия) в концентрации 1×10^5 с использованием специализированной среды для культивирования ММСК (состав см. выше). Культивирование продолжалось до достижения 70-80 % конфлюэнтности.

2. Питательная среда, в которой культивировались ММСК была аспирирована.

3. Культуру клеток фиксировали, используя 4% раствор формальдегида в течение 5-10 минут при комнатной температуре.

4. Осторожно аспирировали 4% раствор формальдегида и промывали три раза по 5-10 минут фосфатным буфером (pH 7,4).

5. Был добавлен блокирующий раствор к клеткам не менее, чем на 2 часа при комнатной температуре или на 12 - 16 часов при 40°C. Блокирующих растворов было 2 разновидности: блокирующий раствор и непроникающий блокирующий раствор. Состав блокирующего раствора: 5% нормальная ослиная сыворотка с 0,3% раствора TritonX-100 в фосфатном буфере. Данный раствор был добавлен в лунки к клеткам, где в дальнейшем будет определяться наличие фибронектина, коллагена I типа и интегрин- $\beta 1$. Состав непроникающего

блокирующего раствора: 5% нормальная ослиная сыворотка в фосфатном буфере. Данный раствор был добавлен в лунки к клеткам, где в дальнейшем будет определяться наличие следующих кластеров дифференцировки: CD54, CD45 и CD14.

6. Рабочая концентрация первичных антител была приготовлена путем разведения: а) кроличьи антитела к интегрину- $\beta 1$ (20 мкл): 1/500. б) мышинные антитела к CD 54 (100 мкл): 1/100. в) кроличьи антитела к коллагену I типа (исходно содержание антител в 20 мкл - 20 мкг): 1/500 – итоговая концентрация антител - 2 нг/мкл. г) кроличьи антитела к фибронектину (исходно содержание антител в 10 мкл – 10 мкг): 1/1500 - итоговая концентрация антител 0,66 нг/мкл.) мышинные антитела к CD 14 (исходно содержание антител в 10 мкл - 10 мкг): 1/1000 - используемая при иммуноцитохимическом исследовании концентрация антител 1 нг/мкл. е) мышинные антитела к CD 45 (исходно содержание антител в 100 мкл - 100 мкг): 1/100 – используемая при иммуноцитохимическом исследовании концентрация антител 10 нг/мкл.

7. С целью исключения неспецифического связывания были проведены исследования с IgG мыши и IgG кролика. Для этого в лунки, которые служат контролем, были добавлены PBS и указанные IgG в количествах, соответствующих объемам фосфатного буфера и первичных антител в опытных лунках.

8. Инкубирование клеток с антителами в течение 12 - 16 часов при 4°C.

9. С целью удаления несвязанных антител к клеточным культурам был добавлен фосфатный буфер (500 мкл) и, в последующем, аспирирован через 5-10 минут. Эту процедура была повторена четыре раза.

10. В качестве вторичных антител были использованы меченные флюорохромом Cy3 ослиные антитела к IgG мыши и IgG кролика (Millipore, США). Указанные вторичные антитела были предварительно разведены в фосфатном буфере в соотношении 1:250.

11. После добавления соответствующих вторичных антител к первичным антителам инкубирование продолжалось в течение 2 часов в темной комнате. 12.

С целью удаления несвязанных антител к клеточным культурам добавлен фосфатный буфер (500 мкл) и, в последующем, аспирирован через 5-10 минут. Эту процедура была повторена четыре раза.

13. Визуализация ядер клеток обеспечивается применением раствора DAPI / Antifade solution (Millipore, США).

14. С целью удаления избытка флюорохрома DAPI добавлен фосфатный буфер (500 мкл) и, в последующем, аспирирован через 5-10 минут. Эта процедура была повторена четыре раза.

15. Визуализация клеток с использованием флуоресцентного микроскопа. Проведенные исследования с использованием набора антител позволили доказать принадлежность полученной культуры к ММСК.

2.4.4. Иммунофенотипирование ММСК

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) (рисунок).

1. Образцы клеток промыли 2 мл красящего буфера Staining Buffer (Bio-Techne, США).

2. Центрифугировали при 300 x g в течение 5 минут.

3. К клеточной суспензии (1×10^6 клеток) добавили по 10 мкл каждого антитела: CD105/Endotelin-CFS, CD29/Integrin β 1-PE, Sca-1-APC, CD45-PerCP.

4. Инкубировали смесь в течение 40 мин при комнатной температуре в темноте.

5. Промыли суспензию клеток красящим раствором Staining Buffer (Bio-Techne, США), чтобы удалить лишние антитела.

6. Ресуспендировали клетки в 400 мкл красящего раствора Staining Buffer (Bio-Techne, США) для последующего проведения анализа на проточном цитометре.

Количество жизнеспособных клеток с фенотипом CD45-CD105+Sca1+CD29+ составило 93,5 % (рисунок 2.4).

Оценку качества работы цитометра проводили ежедневно, включая проверку сигналов светорассеяния и флуоресценции с использованием калибровочных частиц Flow Chek Fluorespheres (Beckman Coulter, США) и стандартных настроечных протоколов.

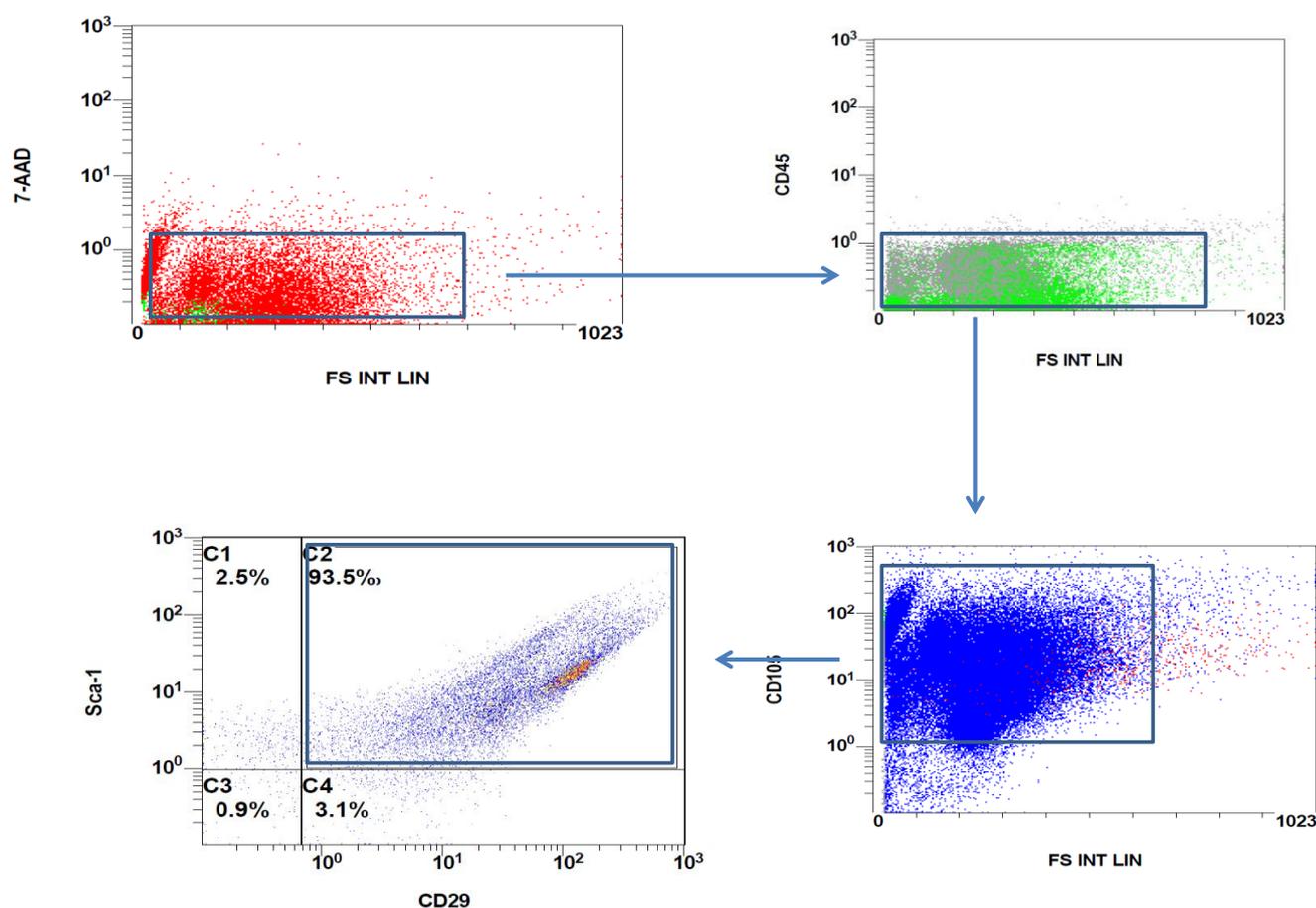


Рисунок 2.4. Иммунофенотипирование ММСК.

2.5. Подсчет и определение жизнеспособности клеток

Перед трансплантацией определяли жизнеспособность вводимых клеток.

Методика подсчета клеток:

1. Было произведено тщательное перемешивание суспензии клеток, после этого, 20 мкл данной суспензии было перемещено в отдельную пробирку.

2. В дальнейшем было проведено разведение 1/20: 20 мкл клеточной суспензии добавлено к 380 мкл 3% уксусной кислоты с метиленовым синим («StemCell Technologies», Канада). 3% уксусная кислота необходима для разрушения цитоплазматической мембраны клетки, без повреждения ядра клетки. Краситель метиленовый синий обеспечивает визуализацию ядер.

3. Тщательное перемешивание суспензии клеток.

4. Подсчет клеток в камере Горяева был произведен по формуле:

$$X=A * 50 * 10^3(1)$$

(1) где: А – число клеток в 100 больших квадратах камеры Горяева; X- число клеток в 1 мл.

Жизнеспособность клеток определялась посредством суправитальной окраски раствором трипанового синего. Применение трипанового синего позволяет идентифицировать поврежденные и мертвые клетки, в то время как окрашивание жизнеспособных клеток данным раствором не происходит.

Методика определения жизнеспособности клеток с помощью трипанового синего:

1. После тщательного перемешивания суспензии клеток 100 мкл данной суспензии было перемещено в отдельную пробирку.

2. К суспензии клеток было добавлено 100 мкл 0,2 % раствор трипанового синего («StemCell Technologies», Канада) (соотношение 1:1).

3. Произведено тщательное перемешивание суспензии клеток.

4. В течение 10 минут было проведено инкубирование клеток с трипановым синим при комнатной температуре. Ограничение времени инкубирования (менее 15 минут) обусловлено реализацией токсического эффекта трипанового синего на клетки, который выражается в повреждении цитоплазматической мембраны клетки и последующим прокрашиванием всех клеток данным красителем.

5. Подсчет клеток в 5 больших квадратах камеры Горяева (или ≥ 100 клеток).

При визуализации мертвые клетки прокрашиваются синим цветом. Жизнеспособные клетки не прокрашиваются трипановым синим. Содержание жизнеспособных клеток определялось по формуле:

$$\text{Жизнеспособные клетки, \%} = \frac{\text{Количество клеток без трипанового синего} * 100 \%}{\text{Общее количество подсчитанных клеток}} \text{ (прокрашенных и не прокрашенных трипановым синим).}$$

Жизнеспособность выделенных клеток перед трансплантацией составляла 95 – 97 %.

2.6. Оценка хоуминга ММСК

2.6.1. Приготовление раствора акридина оранжевого для оценки хоуминга ММСК

К 50 мкл. 1% раствора акридинового оранжевого добавлено 2,5 мл. 0,9 % NaCl. Для окрашивания суспензии клеток к ней был добавлен 0,02 % раствор акридинового оранжевого в соотношении 1:1. Проведено инкубирование в темноте в течение 20 мин. С целью отмывки от акридинового оранжевого суспензия клеток была центрифугирована 15 мин при 1000 g.

Резекция 70 % печени у крыс выполнена по методике G.M. Higgins, R.M. Anderson. Введение клеток производили сразу после выполнения субтотальной резекции. Живые клетки во вводимой смеси составляли 95-97%. Введение ММСК, меченых акридиновым оранжевым, осуществлялось внутривенно, в дозе

4 млн.кл/кг. массы тела. Анализ распределения ММСК проводился через 3 и 24 часа.

2.6.2. Получение суспензии клеток органов: легкое, селезенка, сердце, тонкий кишечник, почка, печень

Образец ткани органа с целью удаления крови был промыт в стерильном фосфатном буфере pH 7,2 - Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS; StemCell Technologies, США), помещен в стерильную чашку Петри диаметром 6 см с 3,8 мл раствора Аккутазы (Millipore, США). Раствор аккутазы обеспечивает ферментативное разрушение межклеточных контактов, не разрушая при этом мембрану клеток. Ткань органа была измельчена с помощью маленьких ножниц. Полученная суспензия была инкубирована на шейкере при медленном покачивании в течение 7 минут при температуре 37⁰С. С целью удаления дебриса суспензия клеток была профильтрована через фильтры на 70 мкм (Millipore, США).

Подсчет общего количества клеток производился в камере Горяева.

Костный мозг извлекали из бедренной кости.

С помощью флуоресцентной микроскопии осуществлялся подсчет клеток, окрашенный акридиновым оранжевым. Для акридинового оранжевого была использована длина волны возбуждения 502 нм. Гистологические препараты печени анализировались с помощью флуоресцентного микроскопа Carl Zeiss (Германия) при увеличении x 400 Производился анализ количества клеток в тканях в процентах от введенных ММСК.

2.7. Моделирование субтотальной резекции печени у животных

Метод частичной 2/3 гепатэктомии у мышей (Claudia Mitchell & Holger Willenbring).

Протокол операции.

1. Лабораторное животное было помещено в камеру из оргстекла для обеспечения наркоза 2%-ным раствором форана и потоком кислорода 2 л/мин.

После наркотизации мышь была перенесена на подушку из пенопласта. Дальнейшее поддержание состояния наркоза обеспечивалось путем вдыхания фторана через мундштук.

2. Дезинфекция кожи производилась 70% этанолом.

3. Был произведен срединный разрез кожи и мышц живота (около 3 см в длину), чтобы выделить мечевидный отросток.

4. Две иглы были вставлены в пенопластовую прокладку с каждой стороны животного на уровне мечевидного отростка; вокруг двух игл была растянута резинка. Была протянута и надета резиновая лента вокруг мечевидной отростка, которая поднимала его вверх и назад.

5. Аналогичным образом, были вставлены две иглы в пенопластовую прокладку с каждой стороны животного на уровне нижнего конца разреза брюшной полости и помещены ретракторы так, чтобы они удерживали открытую брюшную полость, тем самым обнажая печень.

6. Срединная доля печени была подтянута с помощью увлажненного физиологическим раствором хлопкового наконечника, были использованы изогнутые микрохирургические ножницы, чтобы разрезать ложную связку печени (мембрану).

7. С помощью увлажненного хлопкового наконечника были подняты срединная и левая боковая доли печени и прижаты к диафрагме. Был оттянут вниз желудок с помощью микрохирургических щипцов, чтобы обеспечить возможность визуализировать и разрезать мембрану, которая связывает хвостатую часть и левую боковую долю печени.

8. Шелковая нить была помещена в основание левой боковой доли (близко к воротам печени) с помощью микрохирургических щипцов. С помощью ватного тампона левая боковая доля печени была повернута в исходное положение, правый конец шовного материала с помощью микрохирургических щипцов удерживался так, чтобы шов прошел вокруг резецируемой части.

9. С помощью держателя иглы щипцов для микрохирургии связали два конца шовного материала через верхнюю часть левой боковой доли печени, поместив узел как можно ближе к основанию доли.

10. Были использованы изогнутые ножницы для микрохирургии, чтобы перерезать перевязанную резецируемую часть чуть выше шва.

11. Нить для второго узла была помещена между культей и срединной долей. 12. При завязывании второго узла сам шов срезался по всей доле. Была разрезана перевязанная средняя доля печени над швом, и оставлена ишемизированная культя над узлом, а небольшая часть еще кровоснабжаемой средней доли печени под ним.

13. Была ушита брюшина и кожа.

14. После ушивания брюшной полости кожа, окружающая шов была обработана 70% спиртом. Мышь была уложена на грелку

Пункты 1-14 заняли около 15-20 мин. [151]

2.8. Моделирование токсического гепатита у животных

Ввели 50 мкг/кг раствора CCl_4 на оливковом масле однократно внутрибрюшинно. На месте прокола выбрили шерсть и обработали 70% спиртом. Мышь зафиксировали головой вниз. Заднюю лапу со стороны введения иглы вытянули. Взяли короткую иглу с тупым концом. В нижней трети живота, отступив от срединной линии влево, прокололи одновременно кожу, мускулатуру и брюшину (при проколе специфический треск). Иглу ввели почти в горизонтальном положении (под углом $10-15^\circ$) на глубину 0,3-0,5 см, а затем вместе со шприцом перевели в горизонтальное положение и медленно ввели раствор.

2.9. Методы оценки состояния регенераторных процессов в печени

2.9.1. Биохимический анализ крови

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

2.9.2. Определение концентрации фибриногена в плазме крови

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

Порядок определения концентрации фибриногена:

1. Исследуемая плазма была разведена рабочим раствором буфера в 10 раз (20 мкл плазмы + 180 мкл рабочего раствора трис-буфера).
2. В кювету коагулометра было помещено 0,2 мл разведенной исследуемой плазмы.
3. Производилось инкубирование при +37°C в течение 1 минуты в термостате коагулометра.
4. В ту же кювету было добавлено 0,1 мл рабочего раствора тромбина, имеющего комнатную температуру (+18-+25°C) и начать отсчет времени свертывания.
5. Результаты были получены через 4-40 с.

2.9.3. Морфометрические показатели

Подготовку образцов ткани 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 Primo Star (Carl Zeiss, Германия) на базе микроскопа Primo Star (Carl Zeiss, Германия) при увеличении $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$, $\times 600$, $\times 1000$ (не менее 10 полей зрения в каждом гистологическом срезе). Производилась оценка следующих морфометрических показателей печени: количество гепатоцитов на 1 мм^2 , площадь гепатоцитов, площадь ядра гепатоцита, площадь цитоплазмы гепатоцита = площадь гепатоцита – площадь ядра гепатоцита, ядерно-цитоплазматический индекс (ЯЦИ), количество двухъядерных гепатоцитов на 1 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.

2.9.4. Определение выраженности апоптоза

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).

I этап - депарафинизация тканевых срезов

1. Образец был погружен в ксилол 3 раза по 5 минут.

2. Образец был погружен в 95 % этиловый спирт 3 раза по 5 минут и 1 раз в 70% этиловый спирт на 5 минут.

3. Образец был погружен в PBS pH 7,2 (StemCell Technologies, Канада) однократно в течение 5 минут.

II этап - предварительная подготовка препарата

1. Свежеприготовленный раствор в рабочей концентрации 50 мкг/мл Протеиназы К был добавлен к гистологическому препарату. Инкубирование Протеиназы К с гистологическим срезом составляла 15 минут при комнатной температуре. Раствор Протеиназы К в объеме 1,5 мкл (5 мг/мл) был разведен в 150 мкл PBS. Указанный объем рабочей концентрации фермента был нанесен на площадь гистологического препарата в 5 см².

2. Гистологический препарат, располагая вертикально, был осторожно промыт раствором PBS. Раствор PBS при этом был направлен поверх гистологического среза.

3. Образец был погружен 2 раза в дистиллированную воду каждый раз на 2 минуты.

III этап.

1. Гистологический препарат был инкубирован с 10% козьей сывороткой (Santa Cruz Biotech, США) в фосфатном буфере в течение 20 минут для исключения неспецифического связывания IgG.

2. Препарат был погружен в PBS на 2 минуты.

IV этап - инкубирование с первичными антителами в течение 60 минут.

1. Первичные антитела к ферменту каспаза-3 (Santa Cruz Biotech, USA). Флакон содержит 200 мкг IgG в 1 мл PBS. Производителем рекомендовано использовать разведение данных антител в 50 – 500 раз в PBS с содержанием козьей сыворотки 1,5 % (Santa Cruz Biotech, USA). С целью получения рабочей концентрации первичных антител на 1 срез было израсходовано: 2 мкл антител к каспазе-3 в 96,5 мкл PBS с добавлением 1,5 мкл 100 % козьей сыворотки.

2. Гистологический препарат был погружен 3 раза по 5 минут в PBS.

3. Осторожно был удален избыток жидкости с гистологического препарата.

V этап - инкубирование в темноте с вторичными антителами в течение 45 минут.

1. Вторичные антитела - donkey anti-goat IgG-FITC (Santa Cruz Biotech, USA). Флакон содержит 200 мкг IgG. Производителем рекомендовано использовать разведение данных антител в 100-400 раз. С целью получения рабочей концентрации вторичных антител на 1 срез было израсходовано: 1 мкл donkey anti-goat IgG-FITC в 97,5 мкл PBS с добавлением 1,5 мкл 100 % ослиной сыворотки.

2. Гистологический препарат был погружен 3 раза по 5 минут в PBS.

3. Осторожно был удален избыток жидкости с гистологического препарата.

VI этап – визуализация.

1. С целью визуализации ядер гепатоцитов был добавлен краситель DAPI – 15 мкл.

2. Покровное стекло было зафиксировано поверх гистологического среза с использованием среды Biomount. (BD Biosciences, США)

3. Визуализация препарата.

Для флуорохромов DAPI и FITC были использованы длины волн возбуждения соответственно 365 нм и 470 нм. Гистологические препараты печени анализировались с помощью флуоресцентного микроскопа Carl Zeiss (Германия) при увеличении x 400 (рисунок 2.5).

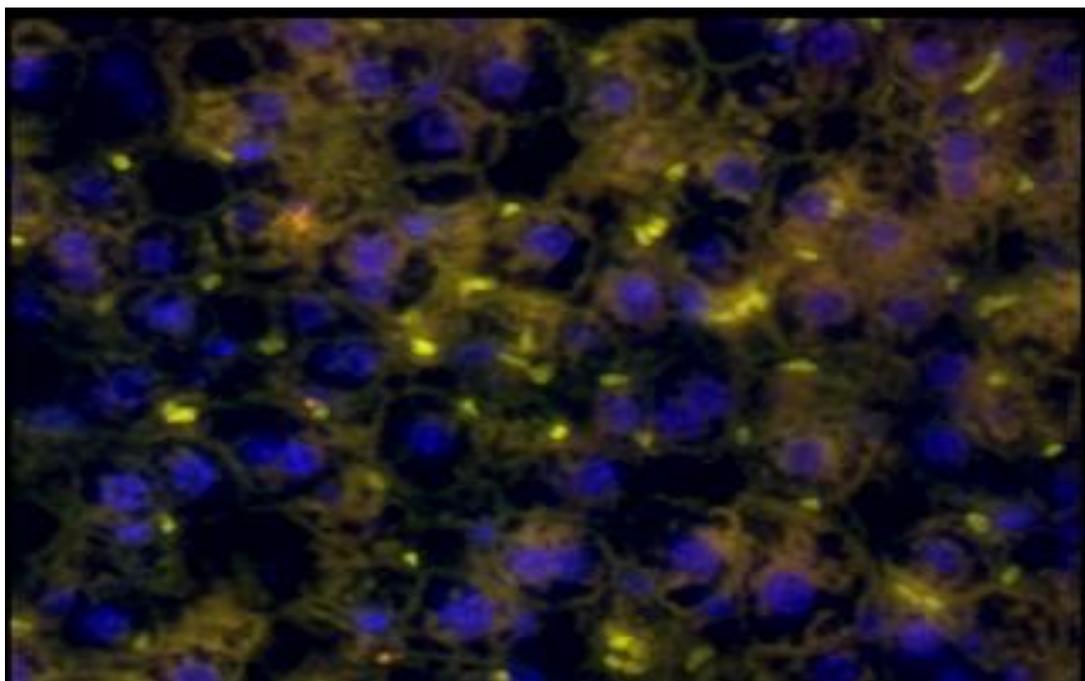


Рисунок 2.5. Флуорохромы DAPI и FITC (ув. x 400)

Уровень запрограммированной гибели гепатоцитов был определен путем подсчета апоптотического индекса:

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

2.9.5. Микроядерный тест на гепатоцитах мышей.

Подготовка клеток.

1. В пробирке объемом 15 мл был приготовлен раствор, содержащий в 10 мл стерильного PBS, 5 мг коллагеназы, 5 мг проназа и 1 мг ДНКазы.
2. Оперативным путем была получена хвостовая доля печени.
3. В ламинарном боксе при использовании стерильного лезвия, хвостатая доля печени была измельчена в течение 1 минуты в стерильной чашке Петри.

4. Полученную массу поместили в пробирку с приготовленным ранее раствором PBS с ферментами.

5. Полученная суспензия была инкубирована на шейкере при покачивании 1-2 цикла в секунду в течение 45 минут при температуре 37°C в условиях водяной бани.

6. В дальнейшем суспензия клеток была профильтрована через фильтры с размером пор 70 мкм (Millipore, США) с использованием 2 мл DMEM.

7. Несколько капель густой суспензии клеток пастеровской пипеткой нанесли на предметное стекло.

8. Просушить препарат на воздухе

Окрашивание препарата.

1. Поместить препарат на 10 минут в свежеприготовленную смесь из абсолютного этанола и 45% ледяной уксусной кислоты (3:1). Просушить на воздухе.

2. Окрашивать свежеотфильтрованным раствором ацетоорсеина в течение 1 часа.

3. Промыть в двух сменах 45% уксусной кислоты по 4 минуты в каждой. Сполоснуть в дистиллированной воде, просушить на воздухе.

4. Погрузить в 1% раствор светлого зеленого на 3 минуты. Промыть в двух сменах дистиллированной воды по 5 минут в каждой. Просушить на воздухе.

У интактных мышей встречается от 1 до 10 гепатоцитов с микроядрами на 1000, в среднем около 4%. [17, 46, 143].

2.10. 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 $p < 0,05$.

ГЛАВА 3

ВЛИЯНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ММСК НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ НЕПОВРЕЖДЕННОЙ И ПОВРЕЖДЕННОЙ ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ

Для определения влияния трансплантации ММСК на морфофункциональное состояние неповрежденной и поврежденной печени производилось оценка хоуминга ММСК в физиологических условиях и при резекции печени. В тоже время проводился анализ влияния ММСК у зрелых и старых лабораторных мышей в физиологических условиях, в у словиях субтотальной рзекции печени, а также на фоне токсического гепатита на биохимических и морфометрических показателей печени. Для оценки выраженности мутагенеза в печени в физиологических условиях и при её повреждении проводился анализ частоты цитогенетически измененных гепатоцитов с помощью проведения микроядерного теста.

Часть I. Оценка хоуминга мультипотентных мезенх имальных стромальных клеток в физиологических условиях и после субтотальной резекции

Для оценки хоуминга мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток у лабораторных животных в физиологических условиях и в условиях субтотальной резекции печени производилось определение их количества в различных органах и тканях.

Через 24 часа после введения меченых клеток в периферической крови, легком, селезенке, костном мозге, тонкой кишке, почке, печени в физиологических условиях отмечено отсутствие достоверных изменений после

внутривенного введения по сравнению с данными на 3 часа. Изучая данные количественного распределения трансплантированных клеток в сердце, отмечено, что клетки, меченные акридин оранжеевым в данном органе не обнаружены. В печени достоверных изменений содержания меченых ММСК через 24 часа после трансплантации клеток не обнаружено по сравнению с данными на 3 часа (таблица 3.1.1).

Таблица 3.1.1

Распределение меченых акридин оранжеевым ММСК в органах и тканях крысы без резекции печени, $M \pm m$, $n=5$

Орган, ткань	% от введенных клеток	
	3 часа	24 часа
Периферическая кровь	1,12±0,137	1,03±0,092
Легкое	1,78±0,162	1,65±0,160
Селезенка	0,92±0,068	0,88±0,065
Костный мозг	1,02±0,096	0,91±0,098
Сердце	Не обнаружено	Не обнаружено
Тонкая кишка	0,87±0,076	0,81±0,079
Почка	0,76±0,079	0,69±0,083
Печень	1,04±0,092	1,00±0,086

Через 24 часа после резекции печени выявлено отсутствие содержания меченых клеток в периферической крови лабораторных животных. В селезенке, костном мозге, сердце, тонкой кишке меченые клетки не обнаружены. Сравнивая распределение меченых ММСК после резекции печени через 24 часа и через 3 часа в легком, почке и печени выявлено отсутствие существенных изменений. В печени обнаружено существенное увеличение содержания трансплантированных ММСК через 24 часа после резекции печени относительно данных распределения клеток в физиологических условиях (таблица 3.1.2).

Распределение меченых акридин оранжевым ММСК в органах и тканях крысы после резекции печени, $M \pm m$, $n=5$

Орган, ткань	% от введенных клеток	
	3 часа	24 часа
Периферическая кровь	0,88±0,073	Не обнаружено
Легкое	0,58±0,062	0,62±0,019*
Селезенка	Не обнаружено	Не обнаружено
Костный мозг	Не обнаружено	Не обнаружено
Сердце	Не обнаружено	Не обнаружено
Тонкая кишка	Не обнаружено	Не обнаружено
Почка	0,39±0,033	0,41±0,038*
Печень	9,84±0,870	10,24±1,020*

Примечание: * - отличие от содержания меченых ММСК в органах и тканях без резекции печени через 24 часа.

Таким образом, через 24 часа после резекции печени выявлено отсутствие содержания меченых клеток в периферической крови, селезенке, костном мозге, сердце, тонкой кишке лабораторных животных. Сравнивая распределение меченных ММСК после резекции печени через 24 часа и через 3 часа в печени выявлено отсутствие существенных изменений. В то же время анализируя показатели хоуминга введенных клеток через 24 часа в физиологических условиях и после резекции печени обнаружено повышение содержания трансплантированных ММСК в легком, почке и печени. 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.

Часть II. Биохимические и морфометрические показатели зрелых и старых мышей после трансплантации ММСК в физиологических условиях

Для оценки функции печени зрелых и старых лабораторных животных в физиологических условиях после трансплантации плацентарных ММСК производилось определение биохимических и морфометрических показателей печени.

В данном исследовании изучался уровень таких биохимических показателей периферической крови как общий белок, альбумин, фибриноген, мочевины, глюкоза, общий билирубин, активность аланинаминотрансферазы, аспаратаминотрансферазы, щелочной фосфатазы. При гистологическом исследовании препаратов печени производилось определение следующих показателей: количество гепатоцитов на единицу площади, площадь гепатоцитов, площадь ядра гепатоцитов, площадь цитоплазмы гепатоцитов, ядерно-цитоплазматический индекс, количество двухъядерных гепатоцитов, митотический индекс, апоптотический индекс.

2.1. Биохимические показатели периферической крови зрелых и старых мышей после трансплантации ММСК в физиологических условиях

2.1.1. Биохимические показатели периферической крови зрелых и старых мышей на 1-е сутки после введения ММСК в физиологических условиях

При изучении биохимических показателей периферической крови зрелых лабораторных животных в физиологических условиях на первые сутки после трансплантации ММСК достоверных отличий от данных интактной группы не обнаружено (таблица 3.2.1).

Таблица 3.2.1

Биохимические показатели периферической крови зрелых мышей на 1-е сутки после трансплантации ММСК, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	ММСК
Общий белок, г/л	69,37±3,20	69,36±3,85
Альбумин, г/л	30,03±2,83	32,14±2,89
Мочевина, ммоль/л	5,76±1,28	5,37±1,05
Глюкоза, ммоль/л	6,10±0,57	6,41±0,62
Общий билирубин, мкмоль/л	9,76±1,15	10,60±1,43
АСТ, Ед/л	98,53±8,42	101,09±3,58
АЛТ, Ед/л	82,80±5,11	84,49±3,35
Щел. фосфатаза, Ед/л	67,37±4,03	65,16±4,24
Фибриноген, г/л	3,20±0,20	3,29±0,24

На первые сутки при изучении биохимических показателей периферической крови старых лабораторных животных в физиологических условиях после введения ММСК достоверных отличий от данных интактной группы не выявлено (таблица 3.2.2).

Таблица 3.2.2

Биохимические показатели периферической крови старых мышей на 1-е сутки после трансплантации ММСК, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	ММСК
Общий белок, г/л	73,39±4,42	74,84±3,17
Альбумин, г/л	26,76±2,21	27,40±2,26
Мочевина, ммоль/л	6,20±0,43	6,13±0,66
Глюкоза, ммоль/л	5,93±0,36	6,11±0,44
Общий билирубин, мкмоль/л	10,07±0,46	10,30±0,74
АСТ, Ед/л	102,73±7,83	106,53±9,58
АЛТ, Ед/л	92,87±7,19	91,93±7,08
Щел. фосфатаза, Ед/л	78,61±5,82	76,47±2,92
Фибриноген, г/л	3,8±0,23	3,71±0,24

2.1.2. Биохимические показатели периферической крови зрелых и старых мышей на 3-и сутки после введения ММСК в физиологических условиях

При анализе биохимических показателей периферической крови зрелых мышей в физиологических условиях на третьи сутки после трансплантации ММСК достоверных отличий от данных интактной группы не отмечено (таблица 3.2.3).

Таблица 3.2.3

Биохимические показатели периферической крови зрелых мышей на 3-и сутки после трансплантации ММСК, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	ММСК
Общий белок, г/л	68,31±3,93	66,46±4,38
Альбумин, г/л	30,84±4,25	35,59±4,90
Мочевина, ммоль/л	6,21±0,87	6,79±1,36
Глюкоза, ммоль/л	5,73±0,69	5,91±0,82
Общий билирубин, мкмоль/л	8,90±1,14	8,56±1,28
АСТ, Ед/л	97,26±8,47	99,04±8,01
АЛТ, Ед/л	81,13±8,66	81,20±9,89
Щел. фосфатаза, Ед/л	66,34±5,24	70,53±7,42
Фибриноген, г/л	3,27±0,18	3,17±0,26

При рассмотрении биохимических показателей периферической крови старых лабораторных животных в физиологических условиях на третьи сутки после введения ММСК не обнаружено достоверных отличий от данных интактной группы (таблица 3.2.4).

Таблица 3.2.4

Биохимические показатели периферической крови старых мышей на 3-и сутки после трансплантации ММСК, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	ММСК
Общий белок, г/л	73,07±4,56	73,91±3,01
Альбумин, г/л	27,29±1,93	28,97±2,15
Мочевина, ммоль/л	6,46±0,67	6,26±0,54
Глюкоза, ммоль/л	5,69±0,41	5,79±0,44
Общий билирубин, мкмоль/л	10,04±0,41	10,26±0,68
АСТ, Ед/л	102,39±9,52	106,59±8,93

АЛТ, Ед/л	97,59±7,38	96,24±7,68
Щел. фосфатаза, Ед/л	78,74±6,04	80,26±3,81
Фибриноген, г/л	3,93±0,29	3,87±0,28

2.1.3. Биохимические показатели периферической крови зрелых и старых мышей на 7-е сутки после введения ММСК в физиологических условиях

При рассмотрении биохимических показателей периферической крови зрелых лабораторных животных в физиологических условиях на седьмые сутки после трансплантации ММСК не выявлено достоверных отличий от данных интактной группы (таблица 3.2.5).

Таблица 3.2.5

Биохимические показатели периферической крови зрелых мышей на 7-е сутки после трансплантации ММСК, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	ММСК
Общий белок, г/л	66,46±4,36	68,87±4,76
Альбумин, г/л	31,41±3,38	30,50±3,91
Мочевина, ммоль/л	6,11±0,61	5,51±0,62
Глюкоза, ммоль/л	6,44±0,62	5,86±0,44
Общий билирубин, мкмоль/л	9,37±0,65	9,07±0,82
АСТ, Ед/л	104,56±9,07	94,71±9,25
АЛТ, Ед/л	89,23±4,43	83,99±7,90
Щел. фосфатаза, Ед/л	63,30±4,00	64,64±7,02
Фибриноген, г/л	3,20±0,23	3,21±0,27

При изучении биохимических показателей периферической крови старых лабораторных животных в физиологических условиях на седьмые сутки после введения ММСК достоверных отличий от данных интактной группы не установлено (таблица 3.2.6).

Таблица 3.2.6

Биохимические показатели периферической крови старых мышей на 7-е сутки после трансплантации ММСК, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение
------------	----------

	NaCl	ММСК
Общий белок, г/л	72,24±4,32	70,83±2,63
Альбумин, г/л	27,34±1,99	28,24±2,12
Мочевина, ммоль/л	6,27±0,65	6,11±0,56
Глюкоза, ммоль/л	5,79±0,44	5,96±0,35
Общий билирубин, мкмоль/л	10,13±0,62	10,41±0,53
АСТ, Ед/л	101,19±8,41	98,24±7,44
АЛТ, Ед/л	95,57±7,36	93,13±7,15
Щел. фосфатаза, Ед/л	75,56±5,11	77,73±3,97
Фибриноген, г/л	3,80±0,26	3,74±0,27

Исходя из данных биохимических показателей периферической крови в физиологических условиях на первые, третьи, седьмые сутки можно отметить, что биохимические показатели периферической крови отражающие функцию печени (белковый, углеводный, пигментный обмен) зрелых и старых лабораторных животных, а также показатели цитолиза гепатоцитов (АСТ, АЛТ), щелочная фосфатаза на первые, третьи, седьмые сутки после трансплантации ММСК не отличались от данных лабораторных животных, которым не проводилась трансплантация клеток.

2.2. Морфометрические показатели печени зрелых и старых мышей после трансплантации ММСК в физиологических условиях

2.2.1. Морфометрические показатели печени зрелых и старых мышей на 1-е сутки после введения ММСК в физиологических условиях

При анализе морфометрических показателей печени зрелых лабораторных животных в физиологических условиях на первые сутки после введения ММСК не установлено достоверных отличий от данных интактных лабораторных животных (таблица 3.2.7).

Таблица 3.2.7

Морфометрические показатели печени зрелых мышей на 1-е сутки после введения ММСК, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	ММСК
Масса печени, г	2,21±0,17	2,30±0,22
Количество гепатоцитов на 1 мм ²	1 567,57±102,9	1 598,94±103,27
Площадь гепатоцитов, мкм ²	264,9±22,16	262,43±20,86
Площадь ядра гепатоцитов, мкм ²	50,57±3,80	50,39±3,13
Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм ²	214,29±20,44	212,04±9,64
ЯЦИ	0,24±0,03	0,24±0,02
Количество двухъядерных гепатоцитов на мм ²	233,43±12,20	234,14±16,98
МИ ‰	0,76±0,07	0,75±0,05
АИ ‰	0,41±0,05	0,42±0,04

При изучении морфометрических показателей печени старых лабораторных животных в физиологических условиях на первые сутки после трансплантации ММСК отличий от данных интактной группы не обнаружено (таблица 3.2.8).

Таблица 3.2.8

Морфометрические показатели печени старых мышей на 1-е сутки после введения ММСК, М±m, n = 7

Показатели	Значение	
	NaCl	ММСК
Масса печени, г	1,80±0,13	1,78±0,12
Количество гепатоцитов на 1 мм ²	1 323,14±111,31	1 296,14±109,02
Площадь гепатоцитов, мкм ²	297,10±21,14	292,17±18,94
Площадь ядра гепатоцитов, мкм ²	57,60±5,37	59,24±4,19
Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм ²	239,93±16,42	232,93±19,78
ЯЦИ	0,25±0,02	0,26±0,03
Количество двухъядерных гепатоцитов на мм ²	241,06±21,38	239,97±19,26
МИ ‰	0,40±0,05	0,39±0,05
АИ ‰	0,51±0,04	0,52±0,05

2.2.2. Морфометрические показатели печени зрелых и старых мышей на 3-и сутки после введения ММСК в физиологических условиях

При рассмотрении морфометрических показателей печени зрелых лабораторных животных в физиологических условиях на третьи сутки после

введения ММСК не выявлено достоверных отличий от показателей интактной подгруппы (таблица 3.2.9).

Таблица 3.2.9

Морфометрические показатели печени зрелых мышей на 3-и сутки после введения ММСК, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	ММСК
Масса печени, г	2,22±0,14	2,27±0,16
Количество гепатоцитов на 1 мм ²	1 525,57±101,06	1 548,69±122,61
Площадь гепатоцитов, мкм ²	267,54±19,24	264,0±19,40
Площадь ядра гепатоцитов, мкм ²	48,40±3,57	49,80±3,0
Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм ²	219,14±7,12	214,20±17,49
ЯЦИ	0,22±0,02	0,23±0,01
Количество двухъядерных гепатоцитов на мм ²	234,43±19,63	235,86±10,12
МИ ‰	0,74±0,06	0,75±0,06
АИ ‰	0,43±0,04	0,41±0,04

На третьи сутки в физиологических условиях после трансплантации ММСК, при анализе морфометрических показателей печени старых лабораторных животных, не зарегистрировано достоверных отличий от данных интактных лабораторных животных (таблица 3.2.10).

Таблица 3.2.10

Морфометрические показатели печени старых мышей на 3-и сутки после введения ММСК, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	ММСК
Масса печени, г	1,81±0,15	1,77±0,11
Количество гепатоцитов на 1 мм ²	1 301,14±124,98	1 320,29±112,33
Площадь гепатоцитов, мкм ²	310,77±28,80	305,40±23,29
Площадь ядра гепатоцитов, мкм ²	58,61±3,61	57,40±3,63
Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм ²	244,18±22,62	248,00±21,69
ЯЦИ	0,23±0,02	0,23±0,02
Количество двухъядерных гепатоцитов на мм ²	241,66±19,08	242,79±19,16

МИ ‰	0,39±0,04	0,40±0,04
АИ ‰	0,49±0,04	0,52±0,05

2.2.3. Морфометрические показатели печени зрелых и старых мышей на 7-е сутки после введения ММСК в физиологических условиях

При изучении морфометрических показателей печени зрелых лабораторных животных в физиологических условиях на седьмые сутки после введения ММСК, не было обнаружено достоверных отличий от данных интактной подгруппы (таблица 3.2.11).

Таблица 3.2.11

Морфометрические показатели печени зрелых мышей на 7-е сутки после введения ММСК, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	ММСК
Масса печени, г	2,18±0,11	2,12±0,11
Количество гепатоцитов на 1 мм ²	1 538,14±103,59	1 543,96±111,73
Площадь гепатоцитов, мкм ²	264,67±20,02	261,30±22,74
Площадь ядра гепатоцитов, мкм ²	50,46±3,29	48,40±2,71
Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм ²	214,21±19,50	212,90±22,23
ЯЦИ	0,24±0,02	0,23±0,02
Количество двухъядерных гепатоцитов на мм ²	237,29±18,24	235,86±20,16
МИ ‰	0,73±0,06	0,76±0,05
АИ ‰	0,39±0,03	0,41±0,04

При анализе морфометрических показателей печени старых лабораторных животных на седьмые сутки в физиологических условиях после трансплантации ММСК, не было выявлено значимых различий с показателями интактных лабораторных животных (таблица 3.2.12).

Таблица 3.2.12

Морфометрические показатели печени старых мышей на 7-е сутки после введения ММСК, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение
------------	----------

	NaCl	ММСК
Масса печени, г	1,76±0,13	1,79±0,14
Количество гепатоцитов на 1 мм ²	1 296,29±119,84	1 339,29±114,81
Площадь гепатоцитов, мкм ²	293,69±21,25	296,19±21,07
Площадь ядра гепатоцитов, мкм ²	59,41±4,44	58,50±4,11
Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм ²	234,27±19,12	237,69±18,76
ЯЦИ	0,25±0,02	0,25±0,03
Количество двухъядерных гепатоцитов на мм ²	239,71±21,30	237,61±21,76
МИ ‰	0,38±0,05	0,39±0,04
АИ ‰	0,51±0,04	0,53±0,05

Таким образом анализ изучаемых данных морфологических показателей печени в физиологических условиях на первые, третьи, седьмые сутки свидетельствует об отсутствии эффекта на трансплантацию ММСК в обеих возрастных группах.

Часть III. Биохимические и морфометрические показатели после трансплантации ММСК зрелых и старых мышей с субтотальной резекцией печени

Для оценки функции печени зрелых и старых лабораторных животных в условиях субтотальной резекции печени после трансплантации ММСК производилось определение биохимических и морфометрических показателей печени.

В данном исследовании изучался уровень таких биохимических показателей периферической крови как общий белок, альбумин, мочевины, фибриноген, глюкоза, общий билирубин, а также активность таких ферментов как аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, щелочная фосфатаза. При гистологическом исследовании препаратов печени производилось определение следующих показателей: количество гепатоцитов на единицу площади, площадь гепатоцитов, площадь ядра гепатоцитов, площадь цитоплазмы гепатоцитов,

ядерно-цитоплазматический индекс, количество двухъядерных гепатоцитов на единицу площади, митотический индекс, апоптотический индекс.

3.1. Биохимические показатели периферической крови после трансплантации ММСК зрелых и старых мышей с субтотальной резекцией печени

3.1.1. Биохимические показатели периферической крови зрелых и старых мышей на 1-е сутки после субтотальной резекции печени

При анализе биохимических показателей периферической крови зрелых лабораторных животных на первые сутки после субтотальной резекции печени выявлено увеличение общего билирубина на 103,37% ($19,84 \pm 2,85$, $p < 0,05$). Отмечено повышение активности АСТ на 323,01% ($416,79 \pm 29,76$, $p < 0,05$), АЛТ на 258,59% ($296,91 \pm 22,64$, $p < 0,05$), щелочной фосфатазы на 102,01% ($136,10 \pm 4,66$, $p < 0,05$). А также отмечено уменьшение общего белка на 26,07% ($51,29 \pm 4,81$, $p < 0,05$), альбуминов на 31,59% ($20,54 \pm 1,89$, $p < 0,05$), мочевины на 34,24% ($3,79 \pm 0,41$, $p < 0,05$) глюкозы на 34,19% ($4,01 \pm 0,53$, $p < 0,05$) по сравнению с данными интактной группы. Достоверных данных об изменении содержания фибриногена по сравнению с показателями интактных животных не отмечено (таблица 3.3.1).

Таблица 3.3.1

Биохимические показатели периферической крови зрелых мышей на 1-е сутки после субтотальной резекции печени, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	Резекция
Общий белок, г/л	$69,37 \pm 3,20$	$51,29 \pm 4,81^1$
Альбумин, г/л	$30,03 \pm 2,83$	$20,54 \pm 1,89^1$
Мочевина, ммоль/л	$5,76 \pm 1,28$	$3,79 \pm 0,41^1$
Глюкоза, ммоль/л	$6,10 \pm 0,57$	$4,01 \pm 0,53^1$
Общий билирубин, мкмоль/л	$9,76 \pm 1,15$	$19,84 \pm 2,85^1$
АСТ, Ед/л	$98,53 \pm 8,42$	$416,79 \pm 29,76^1$

АЛТ, Ед/л	82,80±5,11	296,91±22,64 ¹
Щел. фосфатаза, Ед/л	67,37±4,03	136,10±4,66 ¹
Фибриноген, г/л	3,20±0,20	2,93±0,22

Примечание: ¹ – отличие от интактных зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

При оценке биохимических показателей периферической крови старых лабораторных животных на первые сутки после субтотальной резекции печени выявлено увеличение общего билирубина на 66,67% (16,79±1,56, $p < 0,05$). Отмечено повышение активности АСТ на 350,51% (462,80±31,91, $p < 0,05$), АЛТ на 296,40% (368,14±30,68, $p < 0,05$), щелочной фосфатазы на 108,56% (163,96±30,48, $p < 0,05$). А также отмечено уменьшение общего белка на 28,07% (52,79±3,64, $p < 0,05$), альбуминов на 26,17% (19,77±1,46, $p < 0,05$), мочевины на 29,03% (4,40±0,34, $p < 0,05$) глюкозы на 35,18% (3,84±0,32, $p < 0,05$) по сравнению с данными интактных животных. Достоверных данных об изменении содержания фибриногена по сравнению с показателями интактной группы не выявлено (таблица 3.3.2).

Таблица 3.3.2

Биохимические показатели периферической крови старых мышей на 1-е сутки после субтотальной резекции печени, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	Резекция
Общий белок	73,39±4,42	52,79±3,64 ¹
Альбумин	26,76±2,21	19,77±1,46 ¹
Мочевина, ммоль/л	6,20±0,43	4,40±0,34 ¹
Глюкоза, ммоль/л	5,93±0,36	3,84±0,32 ¹
Общий билирубин, мкмоль/л	10,07±0,46	16,79±1,56 ¹
АСТ, Ед/л	102,73±7,83	462,80±31,91 ¹
АЛТ, Ед/л	92,87±7,19	368,14±30,68 ¹
Щел. фосфатаза, Ед/л	78,61±5,82	163,96±30,48 ¹
Фибриноген, г/л	3,8±0,23	3,47±0,21

Примечание: ¹ – отличие от интактных старых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

Таким образом, на первые сутки после субтотальной резекции печени у зрелых и старых лабораторных животных отмечалось изменение всех биохимических показателей периферической крови кроме содержания фибриногена. Было зарегистрировано уменьшение уровня мочевины и содержания глюкозы, повышение общего билирубина. В то же время отмечено уменьшение общего белка и альбуминов, как показателей белкового обмена в печени в обеих возрастных группах. Также выявлено в обеих возрастных группах возрастание активности АСТ и АЛТ, что свидетельствует о наличии цитолиза гепатоцитов. У зрелых и старых лабораторных животных в это время зарегистрировано увеличение активности щелочной фосфатазы.

3.1.2. Биохимические показатели периферической крови на 1-е сутки после трансплантации ММСК у зрелых и старых мышей с субтотальной резекцией печени

На первые сутки при изучении биохимических показателей периферической крови зрелых лабораторных животных в условиях субтотальной резекции печени после трансплантации ММСК достоверных отличий от данных контрольной подгруппы не установлено (таблица 3.3.3).

Таблица 3.3.3

Биохимические показатели периферической крови на 1-е сутки после трансплантации ММСК у зрелых мышей с субтотальной резекцией печени, $M \pm m$,

$n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	ММСК
Общий белок, г/л	51,29±4,81 ¹	55,20±4,71 ¹
Альбумин, г/л	20,54±1,82 ¹	23,59±2,58 ¹
Мочевина, ммоль/л	3,79±0,41 ¹	3,93±0,42 ¹
Глюкоза, ммоль/л	4,01±0,53 ¹	4,17±0,40 ¹
Общий билирубин, мкмоль/л	19,84±2,85 ¹	18,87±3,31 ¹
АСТ, Ед/л	416,79±29,76 ¹	380,33±45,46 ¹
АЛТ, Ед/л	296,91±22,64 ¹	277,96±22,36 ¹

Щел. фосфатаза, Ед/л	136,10±4,66 ¹	135,83±9,20 ¹
Фибриноген, г/л	2,93±0,22	3,00±0,23

Примечание: ¹ – отличие от интактных зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

На первые сутки при изучении биохимических показателей периферической крови старых лабораторных животных после субтотальной резекции печени на фоне введения ММСК достоверных отличий от данных контрольной подгруппы не выявлено (таблица 3.3.4).

Таблица 3.3.4

Биохимические показатели периферической крови на 1-е сутки после трансплантации ММСК у старых мышей с субтотальной резекцией печени, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	ММСК
Общий белок, г/л	52,79±3,64 ¹	57,56±4,68 ¹
Альбумин, г/л	19,77±1,46 ¹	22,19±2,93 ¹
Мочевина, ммоль/л	4,40±0,34 ¹	4,59±0,33 ¹
Глюкоза, ммоль/л	3,84±0,32 ¹	4,04±0,31 ¹
Общий билирубин, мкмоль/л	16,79±1,56 ¹	15,83±1,84 ¹
АСТ, Ед/л	462,80±31,91 ¹	446,44±45,42 ¹
АЛТ, Ед/л	368,14±30,68 ¹	350,76±35,49 ¹
Щел. фосфатаза, Ед/л	163,96±30,48 ¹	156,93±25,31 ¹
Фибриноген, г/л	3,47±0,21	3,51±0,24

Примечание: ¹ – отличие от интактных зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

Исходя из вышеизложенного было отмечено, что на первые сутки на фоне субтотальной резекции печени после трансплантации ММСК зрелым и старым лабораторным животным не выявлено различий между биохимическими показателями периферической крови контрольной и исследуемой подгруппами.

3.1.3. Биохимические показатели периферической крови зрелых и старых мышей на 3-и сутки после субтотальной резекции печени

На третьи сутки после субтотальной резекции печени у зрелых лабораторных животных отмечаются следующие изменения в анализе биохимических показателей периферической крови: увеличение общего билирубина на 147,03% ($21,99 \pm 5,47$, $p < 0,05$). Выявлено повышение активности АСТ на 115,44% ($209,53 \pm 13,85$, $p < 0,05$), АЛТ на 91,35% ($155,24 \pm 9,38$, $p < 0,05$), щелочной фосфатазы на 60,79% ($106,67 \pm 10,45$, $p < 0,05$). А также отмечено уменьшение общего белка на 26,77% ($50,03 \pm 4,82$, $p < 0,05$), альбуминов на 35,80% ($19,80 \pm 2,51$, $p < 0,05$), фибриногена на 38,84% ($2,0 \pm 0,17$, $p < 0,05$), мочевины на 29,66% ($4,37 \pm 2,51$, $p < 0,05$) глюкозы на 36,16% ($3,66 \pm 0,29$, $p < 0,05$) по сравнению с данными интактных животных (таблица 3.3.5).

Таблица 3.3.5

Биохимические показатели периферической крови зрелых мышей на 3-и сутки после субтотальной резекции печени, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	Резекция
Общий белок, г/л	$68,31 \pm 3,93$	$50,03 \pm 4,82^1$
Альбумин, г/л	$30,84 \pm 4,25$	$19,80 \pm 2,51^1$
Мочевина, ммоль/л	$6,21 \pm 0,87$	$4,37 \pm 2,51^1$
Глюкоза, ммоль/л	$5,73 \pm 0,69$	$3,66 \pm 0,29^1$
Общий билирубин, мкмоль/л	$8,90 \pm 1,14$	$21,99 \pm 5,47^1$
АСТ, Ед/л	$97,26 \pm 8,47$	$209,53 \pm 13,85^1$
АЛТ, Ед/л	$81,13 \pm 8,66$	$155,24 \pm 9,38^1$
Щел. фосфатаза, Ед/л	$66,34 \pm 5,24$	$106,67 \pm 10,45^1$
Фибриноген, г/л	$3,27 \pm 0,18$	$2,0 \pm 0,17^1$

Примечание: ¹ – отличие от интактных зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

На третьи сутки после субтотальной резекции печени у старых лабораторных животных отмечаются следующие изменения в анализе биохимических показателей периферической крови: увеличение общего билирубина на 157,75% ($25,89 \pm 2,27 \pm 5,47$, $p < 0,05$). Выявлено повышение активности АСТ на 107,20% ($212,14 \pm 19,08$, $p < 0,05$), АЛТ на 116,73% ($211,50 \pm 18,06$, $p < 0,05$), щелочной фосфатазы на 65,57% ($130,37 \pm 25,94$, $p < 0,05$). А

также отмечено уменьшение общего белка на 34,64% ($47,76 \pm 4,48$, $p < 0,05$), альбуминов на 33,61% ($18,11 \pm 2,36$, $p < 0,05$), фибриногена на 42,24% ($2,27 \pm 0,26$, $p < 0,05$) мочевины на 30,53% ($4,49 \pm 0,39$, $p < 0,05$) глюкозы на 29,85% ($4,13 \pm 0,72$, $p < 0,05$) по сравнению с данными интактной группы (таблица 3.3.6).

Таблица 3.3.6

Биохимические показатели периферической крови старых мышей на 3-и сутки после субтотальной резекции печени, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	Резекция
Общий белок, г/л	$73,07 \pm 4,56$	$47,76 \pm 4,48^1$
Альбумин, г/л	$27,29 \pm 1,93$	$18,11 \pm 2,36^1$
Мочевина, ммоль/л	$6,46 \pm 0,67$	$4,49 \pm 0,39^1$
Глюкоза, ммоль/л	$5,89 \pm 0,41$	$4,13 \pm 0,72^1$
Общий билирубин, мкмоль/л	$10,04 \pm 0,41$	$25,89 \pm 2,27^1$
АСТ, Ед/л	$102,39 \pm 9,52$	$212,14 \pm 19,08^1$
АЛТ, Ед/л	$97,59 \pm 7,38$	$211,50 \pm 18,06^1$
Щел. фосфатаза, Ед/л	$78,74 \pm 6,04$	$130,37 \pm 25,94^1$
Фибриноген, г/л	$3,93 \pm 0,29$	$2,27 \pm 0,26^1$

Примечание: ¹ – отличие от интактных старых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

На третьи сутки, также, как и на первые после субтотальной резекции печени у зрелых и старых лабораторных животных отмечалось изменение всех изучаемых в данном исследовании биохимических показателей периферической крови. Выявлено уменьшение уровня мочевины и содержания глюкозы, повышение общего билирубина. Содержание общего белка, альбуминов и фибриногена было снижено по сравнению с интактными животными в обеих возрастных группах. Сохранялись повышенные показатели активности АСТ, АЛТ и щелочной фосфатазы.

3.1.4. Биохимические показатели периферической крови на 3-и сутки после трансплантации ММСК у зрелых и старых мышей с субтотальной резекцией печени

При изучении биохимических показателей периферической крови зрелых лабораторных животных на третьи сутки на фоне субтотальной резекции печени после трансплантации ММСК выявлено уменьшение активности АСТ на 24,12% ($158,99 \pm 14,38$, $p < 0,05$), АЛТ на 24,81% ($116,73 \pm 12,51$, $p < 0,05$), щелочной фосфатазы на 23,13% ($82,00 \pm 7,26$, $p < 0,05$) по сравнению с интактными животными. Достоверных отличий общего белка, альбумина, мочевины, глюкозы, общего билирубина и фибриногена от данных интактной группы не выявлено (таблица 3.3.7).

Таблица 3.3.7

Биохимические показатели периферической крови на 3-и сутки после трансплантации ММСК у зрелых мышей с субтотальной резекцией печени, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	ММСК
Общий белок, г/л	$50,03 \pm 4,82^1$	$55,61 \pm 4,24^1$
Альбумин, г/л	$19,80 \pm 2,51^1$	$21,60 \pm 3,14^1$
Мочевина, ммоль/л	$4,37 \pm 2,51^1$	$4,59 \pm 0,36^1$
Глюкоза, ммоль/л	$3,66 \pm 0,29^1$	$4,20 \pm 0,46^1$
Общий билирубин, мкмоль/л	$21,99 \pm 5,47^1$	$21,29 \pm 2,36^1$
АСТ, Ед/л	$209,53 \pm 13,85^1$	$158,99 \pm 14,38^{1,2}$
АЛТ, Ед/л	$155,24 \pm 9,38^1$	$116,73 \pm 12,51^{1,2}$
Щел. фосфатаза, Ед/л	$106,67 \pm 10,45^1$	$82,00 \pm 7,26^{1,2}$
Фибриноген, г/л	$2,0 \pm 0,17^1$	$2,11 \pm 0,18^1$

Примечание: ¹ – отличие от интактных зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$; ² – отличие от контрольной подгруппы зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

Также на третьи сутки при изучении биохимических показателей крови старых лабораторных животных, в отличии от зрелых лабораторных животных после субтотальной резекции печени на фоне введения ММСК достоверных отличий от данных контрольной подгруппы не зарегистрировано (таблица 3.3.8).

Таблица 3.3.8

Биохимические показатели периферической крови на 3-и сутки после трансплантации ММСК у старых мышей с субтотальной резекцией печени, $M \pm m$,
 $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	ММСК
Общий белок, г/л	47,76±4,48 ¹	55,34±5,09 ¹
Альбумин, г/л	18,11±2,36 ¹	18,87±2,51 ¹
Мочевина, ммоль/л	4,49±0,39 ¹	4,60±0,51 ¹
Глюкоза, ммоль/л	4,13±0,72 ¹	4,40±0,34 ¹
Общий билирубин, мкмоль/л	25,89±2,27 ¹	24,20±2,06 ¹
АСТ, Ед/л	212,14±19,08 ¹	203,93±19,32 ¹
АЛТ, Ед/л	211,50±18,06 ¹	200,39±18,59 ¹
Щел. фосфатаза, Ед/л	130,37±25,94 ¹	121,07±13,86 ¹
Фибриноген, г/л	2,27±0,26 ¹	2,49±0,24 ¹

Примечание: ¹ – отличие от интактных старых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

Таким образом, на третьи сутки после субтотальной резекции печени у зрелых лабораторных животных выявлен ответ на трансплантацию ММСК со стороны биохимических показателей периферической крови, отражающих цитолиз гепатоцитов. Так, было зарегистрировано, что активность АЛТ, АСТ и щелочной фосфатазы была существенно меньше, чем у лабораторных животных без введения ММСК. У старых лабораторных животных достоверных отличий от данных контрольной подгруппы не зарегистрировано (рисунок 3.1).

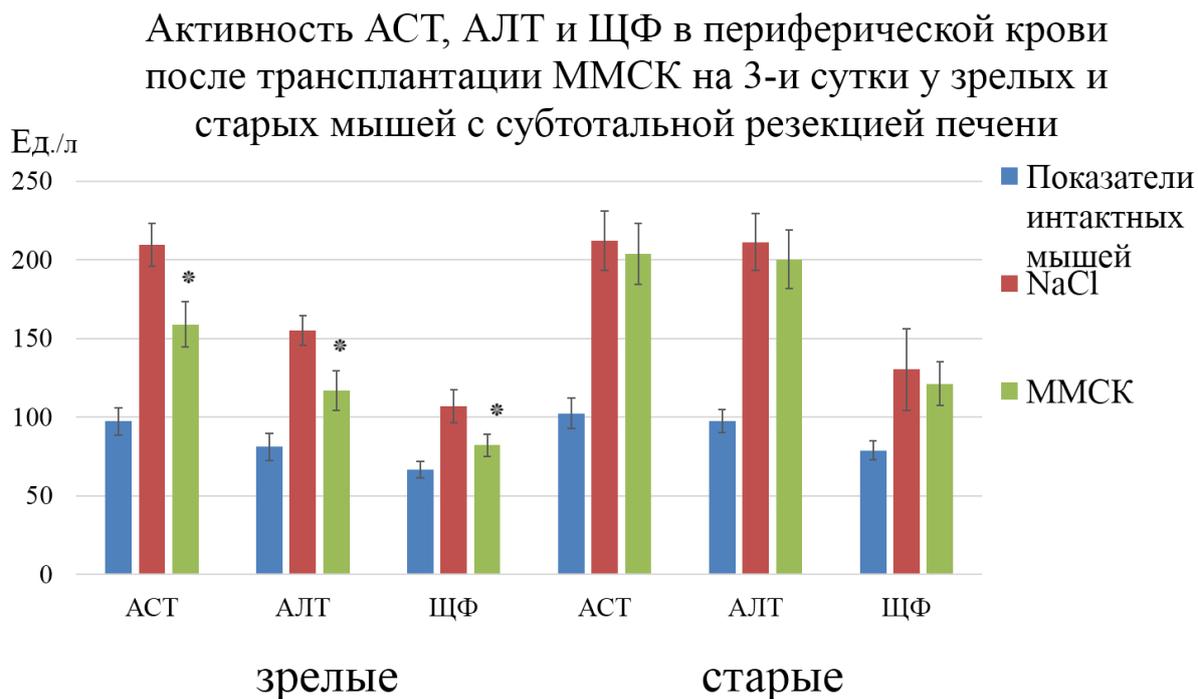


Рисунок 3.1.

3.1.5. Биохимические показатели периферической крови зрелых и старых мышей на 7-е сутки после субтотальной резекции печени

При оценке биохимических показателей периферической крови зрелых лабораторных животных на седьмые сутки после субтотальной резекции печени выявлено увеличение общего билирубина на 64,48% ($15,41 \pm 2,76$, $p < 0,05$). Отмечено повышение активности АСТ на 47,15% ($135,97 \pm 9,92$, $p < 0,05$), АЛТ на 53,65% ($117,04 \pm 11,34$, $p < 0,05$), щелочной фосфатазы на 31,3% ($83,11 \pm 5,93$, $p < 0,05$). А также отмечено уменьшение общего белка на 33,38% ($52,87 \pm 3,34$, $p < 0,05$), альбуминов на 34,47% ($24,47 \pm 2,60$, $p < 0,05$), фибриногена на 31,25% ($2,20 \pm 0,31$, $p < 0,05$), мочевины на 25,23% ($4,57 \pm 0,46$, $p < 0,05$) глюкозы на 33,26% ($4,79 \pm 0,38$, $p < 0,05$) по сравнению с данными интактной группы (таблица 3.3.9).

Таблица 3.3.9

Биохимические показатели периферической крови зрелых мышей на 7-е сутки
после субтотальной резекции печени, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	Резекция
Общий белок, г/л	66,46±4,36	44,27±3,62 ¹
Альбумин, г/л	31,41±3,38	20,59±1,90 ¹
Мочевина, ммоль/л	6,11±0,61	4,57±0,46 ¹
Глюкоза, ммоль/л	6,44±0,62	4,30±0,29 ¹
Общий билирубин, мкмоль/л	9,37±0,65	15,41±2,76 ¹
АСТ, Ед/л	104,56±9,07	153,86±16,96 ¹
АЛТ, Ед/л	89,23±4,43	137,10±16,29 ¹
Щел. фосфатаза, Ед/л	63,30±4,00	83,11±5,93 ¹
Фибриноген, г/л	3,20±0,23	2,20±0,31 ¹

Примечание: ¹ – отличие от интактных зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

При анализе биохимических показателей периферической крови старых лабораторных животных на седьмые сутки после субтотальной резекции печени выявлено увеличение общего билирубина на 69,25% (17,14±2,21, $p < 0,05$). Отмечено повышение активности АСТ на 81,43% (183,59±16,79, $p < 0,05$), АЛТ на 83,12% (175,01±12,82, $p < 0,05$), щелочной фосфатазы на 52,05% (114,89±9,67, $p < 0,05$). А также отмечено уменьшение общего белка на 34,07% (47,63±3,77, $p < 0,05$), альбуминов на 33,70% (18,13±1,42, $p < 0,05$), фибриногена на 35,71% (2,44±0,18, $p < 0,05$), мочевины на 27,56% (4,54±0,35, $p < 0,05$) глюкозы на 26,42% (4,26±0,39, $p < 0,05$) по сравнению с данными интактных животных (таблица 3.3.10).

Таблица 3.3.10

Биохимические показатели периферической крови старых мышей на 7-е сутки
после субтотальной резекции печени, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	Резекция
Общий белок, г/л	72,24±4,32	47,63±3,77 ¹
Альбумин, г/л	27,34±1,99	18,13±1,42 ¹
Мочевина, ммоль/л	6,27±0,65	4,54±0,35 ¹
Глюкоза, ммоль/л	5,79±0,44	4,26±0,39 ¹

Общий билирубин, мкмоль/л	10,13±0,62	17,14±2,21 ¹
АСТ, Ед/л	101,19±8,41	183,59±16,79 ¹
АЛТ, Ед/л	95,57±7,36	175,01±12,82 ¹
Щел. фосфатаза, Ед/л	75,56±5,11	114,89±9,67 ¹
Фибриноген, г/л	3,80±0,26	2,44±0,18 ¹

Примечание: ¹ – отличие от интактных старых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

На седьмые сутки, также, как и на третьи после субтотальной резекции печени у зрелых и старых лабораторных животных отмечалось изменение всех изучаемых в данном исследовании биохимических показателей периферической крови. Было отмечено уменьшение уровня мочевины, фибриногена и содержания глюкозы, повышение общего билирубина. Содержание общего белка и альбуминов, было снижено по сравнению с интактными животными в обеих возрастных группах. Было выявлено повышение показателей активности АСТ, АЛТ и щелочной фосфатазы.

3.1.6. Биохимические показатели периферической крови на 7-е сутки после трансплантации ММСК у зрелых и старых мышей с субтотальной резекцией печени

При оценке биохимических показателей периферической крови зрелых лабораторных животных на седьмые сутки на фоне субтотальной резекции печени после трансплантации ММСК выявлено уменьшение активности АСТ на 32,68% ($103,57 \pm 12,42$, $p < 0,05$), АЛТ на 37,02% ($86,34 \pm 7,52$, $p < 0,05$), щелочной фосфатазы на 22,72% ($64,23 \pm 6,00$, $p < 0,05$) по сравнению с данными контроля. Также отмечается увеличение мочевины на 21,88% ($5,57 \pm 0,48$, $p < 0,05$) и фибриногена на 25,32% ($2,76 \pm 0,24$, $p < 0,05$) по сравнению с контрольной подгруппой. Достоверных отличий общего белка, альбумина, глюкозы, общего билирубина от данных контроля не выявлено (таблица 3.3.11).

Биохимические показатели периферической крови на 7-е сутки после трансплантации ММСК у зрелых мышей с субтотальной резекцией печени, $M \pm m$,
 $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	ММСК
Общий белок, г/л	44,27±3,62 ¹	49,63±2,80 ¹
Альбумин, г/л	20,59±1,90 ¹	23,13±2,32 ¹
Мочевина, ммоль/л	4,57±0,46 ¹	5,57±0,48 ^{1, 2}
Глюкоза, ммоль/л	4,30±0,29 ¹	4,91±0,51 ¹
Общий билирубин, мкмоль/л	15,41±2,76 ¹	14,81±2,02 ¹
АСТ, Ед/л	153,86±16,96 ¹	103,57±12,42 ²
АЛТ, Ед/л	137,10±16,29 ¹	86,34±7,52 ²
Щел. фосфатаза, Ед/л	83,11±5,93 ¹	64,23±6,00 ²
Фибриноген, г/л	2,20±0,31 ¹	2,76±0,24 ²

Примечание: ¹ – отличие от интактных зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$; ² – отличие от контрольной подгруппы зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

На седьмые сутки при изучении биохимических показателей периферической крови старых лабораторных животных после субтотальной резекции печени на фоне введения ММСК выявлено уменьшение активности АСТ на 32,57% (123,80±9,29, $p < 0,05$), АЛТ на 27,24% (127,34±10,12, $p < 0,05$), щелочной фосфатазы на 21,23% (90,50±6,51, $p < 0,05$) по сравнению с данными контроля. В то же время выявлено увеличение фибриногена на 23,98% (3,03±0,20, $p < 0,05$). Достоверных отличий общего белка, альбумина, мочевины, глюкозы, общего билирубина от данных контрольной подгруппы не установлено (таблица 3.3.12).

Таблица 3.3.12

Биохимические показатели периферической крови на 7-е сутки после трансплантации ММСК у старых мышей с субтотальной резекцией печени, $M \pm m$,
 $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	ММСК
Масса печени, г	47,63±3,77 ¹	52,77±3,85 ¹
Альбумин, г/л	18,13±1,42 ¹	20,19±2,16 ¹
Мочевина, ммоль/л	4,54±0,35 ¹	4,97±0,23 ¹

Глюкоза, ммоль/л	4,26±0,39 ¹	4,53±0,36 ¹
Общий билирубин, мкмоль/л	17,14±2,21 ¹	16,34±1,84 ¹
АСТ, Ед/л	183,59±16,79 ¹	123,80±9,29 ^{1, 2}
АЛТ, Ед/л	175,01±12,82 ¹	127,34±10,12 ^{1, 2}
Щел. фосфатаза, Ед/л	114,89±9,67 ¹	90,50±6,51 ^{1, 2}
Фибриноген, г/л	2,44±0,18 ¹	3,03±0,20 ^{1, 2}

Примечание: ¹ – отличие от интактных старых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$; ² – отличие от контрольной подгруппы старых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

Таким образом, на седьмые сутки на фоне субтотальной резекции печени после трансплантации ММСК у зрелых и старых лабораторных животных обнаружены изменения со стороны показателей периферической крови. У зрелых лабораторных животных в ответ на трансплантацию ММСК произошло восстановление активности АСТ, АЛТ, щелочной фосфатазы и содержания фибриногена до значений интактных животных. При этом у старых лабораторных животных активности АСТ, АЛТ, щелочной фосфатазы также существенно снизилось, а содержание фибриногена повысилось относительно контрольной подгруппы, но не достигло значений нормы (рисунок 3.2, 3.3). В то же время у зрелых лабораторных животных отмечено достоверное повышение содержания мочевины в отличие от данных в контрольной подгруппе. Остальные изучаемые показатели белкового, углеводного, пигментного обменов в обеих возрастных группах на фоне введения ММСК не отличались от значений в контрольной подгруппе.

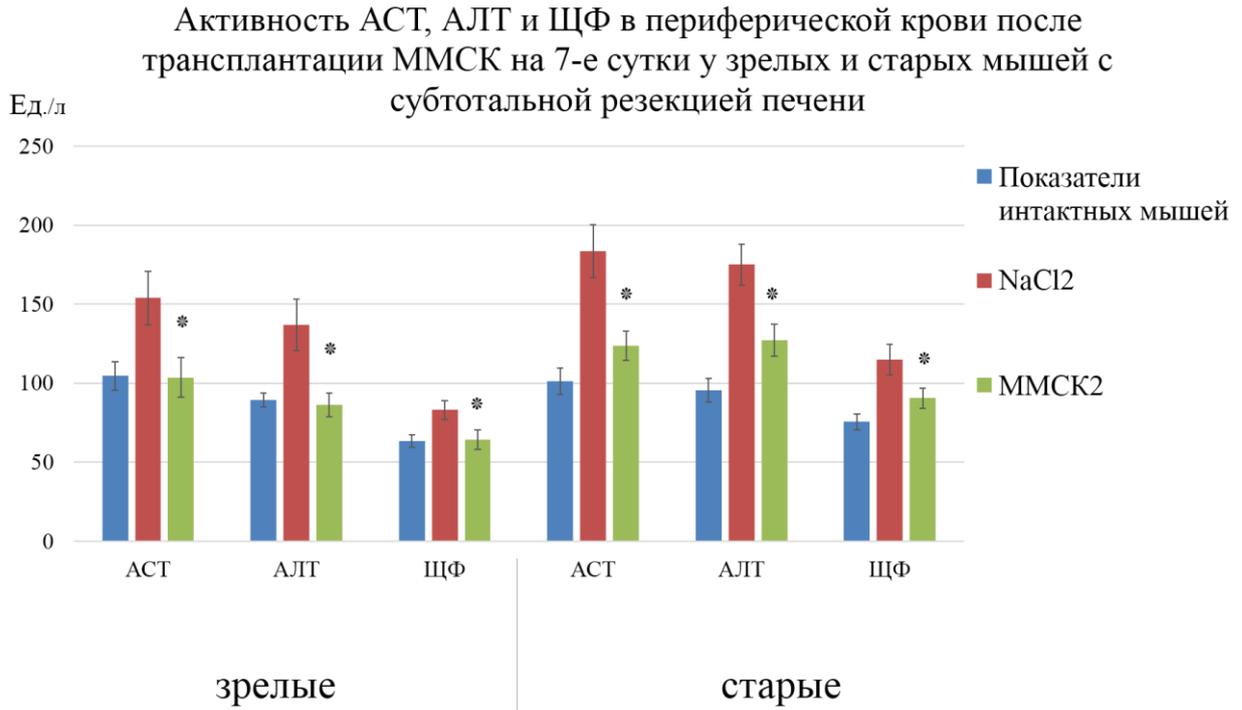


Рисунок 3.2.

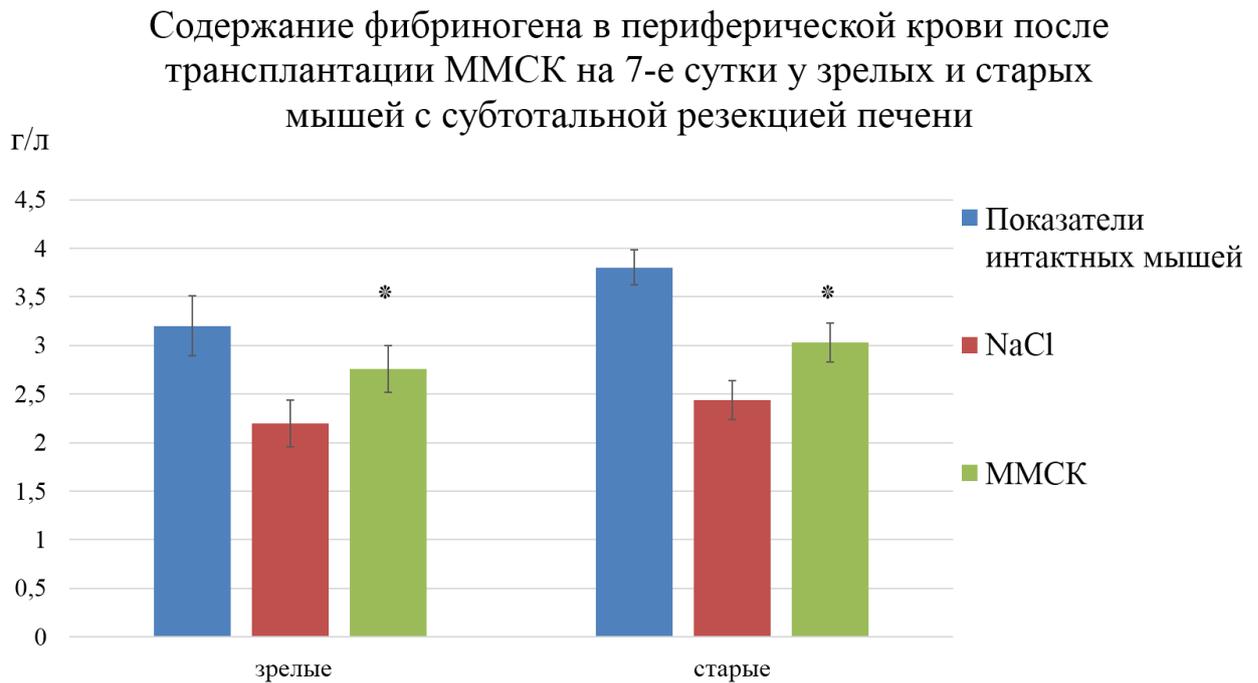


Рисунок 3.3.

3.2. Морфометрические показатели печени после трансплантации ММСК у зрелых и старых мышей с субтотальной резекцией печени

3.2.1. Морфометрические показатели печени зрелых и старых мышей на 1-е сутки после субтотальной резекции печени

При изучении морфометрических показателей печени зрелых лабораторных животных на первые сутки после субтотальной резекции печени было отмечено снижение массы печени на 62,89% ($0,82 \pm 0,07$, $p < 0,05$), уменьшение количества гепатоцитов на 23,9% ($1192,00 \pm 689,43$, $p < 0,05$), увеличение площади гепатоцитов на 28,43% ($340,20 \pm 24,43$, $p < 0,05$), за счет увеличения площади ядра гепатоцитов на 61,44% ($81,64 \pm 7,45$, $p < 0,05$) и площади цитоплазмы гепатоцитов на 20,64% ($258,56 \pm 17,02$, $p < 0,05$), при этом ядерно-цитоплазматический индекс увеличился на 32,43% ($0,32 \pm 0,01$, $p < 0,05$), в то время как митотический индекс достоверно не отличался от данных интактной группы. Также было установлено увеличение количества двухъядерных гепатоцитов на 42,95% ($334,31 \pm 12,30$, $p < 0,05$) и повышение апоптотического индекса на 119,86% ($0,90 \pm 0,06$, $p < 0,05$) по сравнению с данными интактных животных (таблица 3.3.13).

Таблица 3.3.13

Морфометрические показатели печени зрелых мышей на 1-е сутки после субтотальной резекции печени, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	Резекция
Масса печени, г	$2,21 \pm 0,17$	$0,82 \pm 0,07^1$
Количество гепатоцитов на 1 мм^2	$1\ 567,57 \pm 102,90$	$1\ 192,00 \pm 689,43^1$
Площадь гепатоцитов, мкм^2	$264,9 \pm 6,60$	$340,20 \pm 24,43^1$
Площадь ядра гепатоцитов, мкм^2	$50,57 \pm 3,80$	$81,64 \pm 7,45^1$
Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм^2	$214,33 \pm 10,33$	$258,56 \pm 17,02^1$
ЯЦИ	$0,24 \pm 0,03$	$0,32 \pm 0,01^1$
Количество двухъядерных гепатоцитов на мм^2	$233,87 \pm 12,28$	$334,31 \pm 12,30^1$

МИ ‰	0,48±0,07	0,52±0,03
АИ ‰	0,41±0,05	0,90±0,06 ¹

Примечание: ¹ – отличие от интактных зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

Изучая морфометрические показатели печени следует отметить, что у старых лабораторных животных на первые сутки после субтотальной резекции печени также, как и у зрелых лабораторных животных не происходит повышение митотического индекса. При этом масса печени уменьшена на 64,44% ($0,64 \pm 0,05$, $p < 0,05$), количество гепатоцитов снижено на 22,8% ($1021,00 \pm 91,71$, $p < 0,05$) площадь гепатоцитов была увеличена на 21,41% ($360,70 \pm 30,80$, $p < 0,05$) за счет увеличения площади ядра гепатоцитов на 34,70% ($77,59 \pm 6,53$, $p < 0,05$) без существенного изменения площади цитоплазмы гепатоцитов относительно интактных животных. Указанные изменения привели к увеличению ЯЦИ на 40,43% ($0,35 \pm 0,01$, $p < 0,05$) по сравнению с данными интактной подгруппы. Также было установлено увеличение количества двухъядерных гепатоцитов на 28,91% ($310,74 \pm 28,49$, $p < 0,05$) и повышение апоптотического индекса на 111,20% ($1,08 \pm 0,15$, $p < 0,05$) по сравнению с данными интактных животных (таблица 3.3.14).

Таблица 3.3.14

Морфометрические показатели печени старых мышей на 1-е сутки после субтотальной резекции печени, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	Резекция
Масса печени, г	1,80±0,13	0,64±0,05
Количество гепатоцитов на 1 мм ²	1 323,14±111,31	1 021,00±91,71 ¹
Площадь гепатоцитов, мкм ²	297,10±20,77	360,70±30,80 ¹
Площадь ядра гепатоцитов, мкм ²	57,60±3,97	77,59±6,53 ¹
Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм ²	239,50±24,74	225,07±20,25
ЯЦИ	0,25±0,04	0,35±0,01 ¹
Количество двухъядерных гепатоцитов на мм ²	241,06±7,61	310,74±28,49 ¹
МИ ‰	0,40±0,05	0,42±0,03

АИ ‰	0,51±0,04	1,08±0,15 ¹
------	-----------	------------------------

Примечание: ¹ – отличие от интактных старых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

Исходя из вышеописанного было отмечено, что на первые сутки у зрелых и старых лабораторных животных на фоне субтотальной резекции печени не было достоверных данных об изменении митотического индекса в отличии от данных в интактной группе. При этом количество гепатоцитов было снижено в сравнении с интактными животными. При описании состояния внутриклеточной регенерации в обеих возрастных группах было установлено увеличение количества двухъядерных гепатоцитов, апоптотического индекса, а также ядерно-цитоплазматического индекса. Изменение ЯЦИ обусловлено увеличением площади цитоплазмы гепатоцитов (в группе зрелых лабораторных животных), увеличением площади ядра гепатоцитов в обеих возрастных группах относительно показателей интактных лабораторных животных.

3.2.2. Морфометрические показатели печени на 1-е сутки после трансплантации ММСК у зрелых и старых мышей с субтотальной резекцией печени

При анализе данных морфометрических показателей печени зрелых лабораторных животных на первые сутки на фоне субтотальной резекции печени после трансплантации ММСК не было выявлено достоверных изменений по сравнению с показателями контрольной подгруппы (таблица 3.3.15).

Таблица 3.3.15

Морфометрические показатели печени на 1-е сутки после трансплантации ММСК у зрелых мышей с субтотальной резекцией печени, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	ММСК
Масса печени, г	0,82±0,07 ¹	0,79±0,06 ¹
Количество гепатоцитов на 1 мм ²	1 192,00±89,43 ¹	1 227,00±95,71 ¹
Площадь гепатоцитов, мкм ²	340,20±24,43 ¹	356,86±31,22 ¹
Площадь ядра гепатоцитов, мкм ²	81,64±7,45 ¹	85,54±8,47 ¹

Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм ²	258,56±17,02 ¹	271,31±24,16 ¹
ЯЦИ	0,32±0,01 ¹	0,32±0,01 ¹
Количество двухъядерных гепатоцитов на мм ²	334,31±12,30 ¹	325,29±15,39 ¹
МИ ‰	0,52±0,03	0,54±0,04
АИ ‰	0,90±0,06 ¹	0,94±0,09 ¹

Примечание: ¹ – отличие от интактных зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

На первые сутки на фоне субтотальной резекции печени после трансплантации ММСК у старых лабораторных животных не зарегистрировано достоверных изменений в данных морфометрических показателей печени по сравнению с показателями контрольной подгруппы (таблица 3.3.16).

Таблица 3.3.16

Морфометрические показатели печени на 1-е сутки после трансплантации ММСК у старых мышей с субтотальной резекцией печени, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	ММСК
Масса печени, г	0,64±0,05	0,68±0,06
Количество гепатоцитов на 1 мм ²	1 021,00±91,71 ¹	1 048,86±185,88 ¹
Площадь гепатоцитов, мкм ²	360,70±30,80 ¹	351,66±27,47 ¹
Площадь ядра гепатоцитов, мкм ²	77,59±6,53 ¹	76,46±7,07 ¹
Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм ²	225,07±20,25	238,71±18,62
ЯЦИ	0,35±0,01 ¹	0,32±0,01 ¹
Количество двухъядерных гепатоцитов на мм ²	310,74±28,49 ¹	333,60±31,83 ¹
МИ ‰	0,42±0,03	0,43±0,04
АИ ‰	1,08±0,15 ¹	1,11±0,16 ¹

Примечание: ¹ – отличие от интактных старых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

Таким образом, на первые сутки на фоне субтотальной резекции печени после трансплантации ММСК у зрелых и старых лабораторных животных не обнаружено различий изучаемых морфометрических показателей между показателями контрольной и опытной подгрупп.

3.2.3. Морфометрические показатели печени зрелых и старых мышей на 3-и сутки после субтотальной резекции печени

На третьи сутки, в отличие от первых, после субтотальной резекции отмечалось изменение морфометрических показателей печени зрелых лабораторных животных. Было отмечено достоверное уменьшение массы печени на 43,69% ($1,25 \pm 0,09$, $p < 0,05$), уменьшение количества гепатоцитов на 20,9% ($1206,71 \pm 91,96$, $p < 0,05$), увеличение митотического индекса на 1567,65% ($8,10 \pm 0,60$, $p < 0,05$) относительно результатов интактных животных. Зарегистрировано, что площадь гепатоцитов увеличилась на 24,02% ($331,81 \pm 24,02$, $p < 0,05$), площадь ядра гепатоцитов увеличилась на 38,70% ($67,13 \pm 7,01$, $p < 0,05$). Площадь цитоплазмы гепатоцитов остались без достоверных отличий от интактных животных, в то время как ядерно-цитоплазматический индекс увеличился на 22,14% ($0,27 \pm 0,01$, $p < 0,05$). В то же время было обнаружено увеличение количества двухъядерных гепатоцитов на 62,13% ($380,97 \pm 10,15$, $p < 0,05$) и повышение апоптотического индекса на 396,67% ($2,13 \pm 0,20$, $p < 0,05$) по сравнению с данными интактной группы (таблица 3.3.17).

Таблица 3.3.17

Морфометрические показатели печени зрелых мышей на 3-и сутки после субтотальной резекции печени, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	Резекция
Масса печени, г	$2,22 \pm 0,14$	$1,25 \pm 0,09^1$
Количество гепатоцитов на 1 мм^2	$1\ 525,57 \pm 101,06$	$1\ 206,71 \pm 91,96^1$
Площадь гепатоцитов, мкм^2	$267,54 \pm 6,38$	$331,81 \pm 24,02^1$
Площадь ядра гепатоцитов, мкм^2	$48,40 \pm 3,57$	$67,13 \pm 7,01^1$
Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм^2	$219,14 \pm 7,12$	$243,64 \pm 19,25$
ЯЦИ	$0,22 \pm 0,02$	$0,27 \pm 0,01^1$
Количество двухъядерных гепатоцитов на мм^2	$234,99 \pm 9,81$	$380,97 \pm 10,15^1$
МИ %	$0,49 \pm 0,06$	$8,10 \pm 0,60^1$
АИ %	$0,43 \pm 0,04$	$2,13 \pm 0,20^1$

Примечание: ¹ – отличие от интактных зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

При анализе морфометрических показателей печени следует отметить, что у старых лабораторных животных на третьи сутки после субтотальной резекции печени в отличие от первых суток происходит снижение количества гепатоцитов на 23,4% ($996,43 \pm 76,65$, $p < 0,05$) и повышение митотического индекса на 628,89% ($2,81 \pm 0,27$, $p < 0,05$). При этом площадь гепатоцитов была увеличена на 22,06% ($379,31 \pm 32,58$, $p < 0,05$) за счет увеличения площади ядра гепатоцитов на 29,69% ($76,01 \pm 8,56$, $p < 0,05$) без существенного изменения площади цитоплазмы гепатоцитов. Указанные изменения привели к увеличению ЯЦИ на 23,87% ($0,29 \pm 0,01$, $p < 0,05$) по сравнению с данными интактной подгруппы. Также было установлено увеличение количества двухъядерных гепатоцитов на 42,11% ($343,43 \pm 25,8$, $p < 0,05$), повышение апоптотического индекса на 371,18% ($2,29 \pm 0,20$, $p < 0,05$) и снижение массы печени на 42,54% ($1,04 \pm 0,09$, $p < 0,05$) по сравнению с данными интактных животных (таблица 3.3.18).

Таблица 3.3.18

Морфометрические показатели печени старых мышей на 3-и сутки после субтотальной резекции печени, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	Резекция
Масса печени, г	$1,81 \pm 0,15$	$1,04 \pm 0,09^1$
Количество гепатоцитов на 1 мм^2	$1\ 301,14 \pm 124,98$	$996,43 \pm 76,65^1$
Площадь гепатоцитов, мкм^2	$310,77 \pm 13,46$	$379,31 \pm 32,58^1$
Площадь ядра гепатоцитов, мкм^2	$58,61 \pm 3,61$	$76,01 \pm 8,56^1$
Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм^2	$252,16 \pm 15,02$	$261,57 \pm 24,08$
ЯЦИ	$0,23 \pm 0,03$	$0,29 \pm 0,01^1$
Количество двухъядерных гепатоцитов на мм^2	$241,66 \pm 7,65$	$343,43 \pm 25,8^1$
МИ %	$0,39 \pm 0,04$	$2,81 \pm 0,27^1$
АИ %	$0,49 \pm 0,04$	$2,29 \pm 0,20^1$

Примечание: ¹ – отличие от интактных старых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

На третьи сутки в отличие от первых в обеих возрастных группах после субтотальной резекции печени появились данные о достоверном увеличении митотического индекса при снижении количества гепатоцитов. Морфометрические показатели внутриклеточной регенерации, такие как повышение двухъядерных гепатоцитов, площадь гепатоцитов, ядерно-цитоплазматический индекс обусловленный увеличением площади ядра гепатоцитов (только у старых лабораторных животных) и площади цитоплазмы гепатоцитов также были повышены.

3.2.4. Морфометрические показатели печени на 3-и сутки после трансплантации ММСК у зрелых и старых мышей с субтотальной резекцией печени

Также, как и на первые, на третьи сутки на фоне субтотальной резекции печени после трансплантации ММСК у зрелых лабораторных животных не отмечено достоверных изменений в данных морфометрических показателей печени по сравнению с показателями контрольной подгруппы (таблица 3.3.19).

Таблица 3.3.19

Морфометрические показатели печени на 3-и сутки после трансплантации ММСК у зрелых мышей с субтотальной резекцией печени, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	ММСК
Масса печени, г	1,25±0,09 ¹	1,42±0,10 ¹
Количество гепатоцитов на 1 мм ²	1 206,71±91,96 ¹	1 167,86±93,55 ¹
Площадь гепатоцитов, мкм ²	331,81±24,02 ¹	343,71±22,61 ¹
Площадь ядра гепатоцитов, мкм ²	67,13±7,01 ¹	67,89±6,9 ¹
Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм ²	243,64±19,25	237,63±15,94
ЯЦИ	0,27±0,01 ¹	0,29±0,01 ¹
Количество двухъядерных	380,97±10,15 ¹	386,71±21,39 ¹

гепатоцитов на мм ²		
МИ ‰	8,1±0,60 ¹	7,91±0,58 ¹
АИ ‰	2,13±0,20 ¹	1,96±0,19 ¹

Примечание: ¹ – отличие от интактных зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

У старых лабораторных животных, также, как и у зрелых на третьи сутки на фоне субтотальной резекции печени после трансплантации ММСК не установлено достоверных изменений в данных морфометрических показателей печени по сравнению с показателями контрольной подгруппы (таблица 3.3.20).

Таблица 3.3.20

Морфометрические показатели печени на 3-и сутки после трансплантации ММСК у старых мышей с субтотальной резекцией печени, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	ММСК
Масса печени, г	1,04±0,09 ¹	1,11±0,10 ¹
Количество гепатоцитов на 1 мм ²	996,43±76,65 ¹	1 020,14±98,12 ¹
Площадь гепатоцитов, мкм ²	379,31±32,58 ¹	387,04±37,07 ¹
Площадь ядра гепатоцитов, мкм ²	76,01±8,56 ¹	77,39±6,59 ¹
Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм ²	261,57±24,08	269,76±23,42
ЯЦИ	0,29±0,01 ¹	0,29±0,01 ¹
Количество двухъядерных гепатоцитов на мм ²	343,43±25,80 ¹	353,86±36,16 ¹
МИ ‰	2,81±0,27 ¹	2,96±0,52 ¹
АИ ‰	2,29±0,20 ¹	2,16±0,17 ¹

Примечание: ¹ – отличие от интактных старых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

Итак, на третьи сутки на фоне субтотальной резекции печени после трансплантации ММСК у зрелых и старых лабораторных животных, также как и на первые сутки не было обнаружено различий изучаемых морфометрических показателей между показателями контрольной и опытной подгрупп.

3.2.5. Морфометрические показатели печени зрелых и старых мышей на 7-е сутки после субтотальной резекции печени

В морфометрических показателях у зрелых лабораторных животных, так же, как и на третьи, на седьмые сутки после субтотальной резекции печени было отмечено достоверное снижение массы печени на 22,93% ($1,68 \pm 0,11$, $p < 0,05$), увеличение митотического индекса на 808,05% ($4,51 \pm 0,47$, $p < 0,05$) относительно результатов интактных животных. В данной возрастной категории площади цитоплазмы гепатоцитов осталась без достоверных отличий от интактных животных, но ядерно-цитоплазматический индекс увеличился на 20,65% ($0,29 \pm 0,02$, $p < 0,05$) посредством увеличения площади ядра гепатоцитов на 25,62% ($63,39 \pm 5,12$, $p < 0,05$). Площади гепатоцитов к седьмым суткам становится без достоверных отличий от данных интактных животных. В то же время было обнаружено увеличение количества двухъядерных гепатоцитов на 34,86% ($320,77 \pm 10,64$, $p < 0,05$) и повышение апоптотического индекса на 216,30% ($1,25 \pm 0,09$, $p < 0,05$) по сравнению с данными интактной группы (таблица 3.3.21).

Таблица 3.3.21

Морфометрические показатели печени зрелых мышей на 7-е сутки после субтотальной резекции печени, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	Резекция
Масса печени, г	$2,18 \pm 0,11$	$1,68 \pm 0,11^1$
Количество гепатоцитов на 1 мм ²	$1\ 538,14 \pm 103,59$	$1\ 427,71 \pm 116,98$
Площадь гепатоцитов, мкм ²	$264,67 \pm 5,86$	$286,41 \pm 22,44$
Площадь ядра гепатоцитов, мкм ²	$50,46 \pm 3,29$	$63,39 \pm 5,12^1$
Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм ²	$214,21 \pm 8,10$	$223,03 \pm 17,97$
ЯЦИ	$0,24 \pm 0,02$	$0,29 \pm 0,02^1$
Количество двухъядерных гепатоцитов на мм ²	$237,29 \pm 8,19$	$320,77 \pm 10,64^1$
МИ ‰	$0,50 \pm 0,06$	$4,51 \pm 0,47^1$
АИ ‰	$0,39 \pm 0,03$	$1,25 \pm 0,09^1$

Примечание: ¹ – отличие от интактных зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

На седьмые сутки, так же, как и на третьи в морфометрических показателях у старых лабораторных животных после субтотальной резекции печени было

отмечено достоверное снижение массы печени на 34,65% ($1,15 \pm 0,09$, $p < 0,05$), уменьшение количества гепатоцитов на 22,1% ($1009,57 \pm 74,49$, $p < 0,05$), увеличения митотического индекса на 298,48% ($1,5 \pm 0,10$, $p < 0,05$) относительно результатов интактных животных. В данной возрастной категории площади цитоплазмы гепатоцитов осталась без достоверных отличий от интактных животных, но ядерно-цитоплазматический индекс увеличился на 24,51% ($0,32 \pm 0,02$, $p < 0,05$) посредством увеличения площади ядра гепатоцитов на 22,48% ($72,77 \pm 10,32$, $p < 0,05$). Площади гепатоцитов к седьмым суткам увеличилась на 18,56% ($348,19 \pm 28,36$, $p < 0,05$) по сравнению с данными интактных животных. В то же время было обнаружено увеличение количества двухъядерных гепатоцитов на 27,54% ($305,74 \pm 22,52$, $p < 0,05$) и повышение апоптотического индекса на 256,90% ($1,81 \pm 0,17$, $p < 0,05$) по сравнению с данными интактной группы (таблица 3.3.22).

Таблица 3.3.22

Морфометрические показатели печени старых мышей на 7-е сутки после субтотальной резекции печени, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	Резекция
Масса печени, г	$1,76 \pm 0,13$	$1,15 \pm 0,09^1$
Количество гепатоцитов на 1 мм^2	$1\ 296,29 \pm 119,29$	$1\ 009,57 \pm 74,49^1$
Площадь гепатоцитов, мкм^2	$293,69 \pm 12,68$	$348,19 \pm 28,36^1$
Площадь ядра гепатоцитов, мкм^2	$59,41 \pm 2,73$	$72,77 \pm 10,32^1$
Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм^2	$234,27 \pm 14,61$	$227,13 \pm 15,37$
ЯЦИ	$0,26 \pm 0,03$	$0,32 \pm 0,02^1$
Количество двухъядерных гепатоцитов на мм^2	$239,71 \pm 7,02$	$305,74 \pm 22,52^1$
МИ ‰	$0,38 \pm 0,05$	$1,5 \pm 0,10^1$
АИ ‰	$0,51 \pm 0,04$	$1,81 \pm 0,17^1$

Примечание: ¹ – отличие от интактных старых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

На седьмые сутки, также, как и на третьи в обеих возрастных группах после субтотальной резекции печени регистрировались данные о достоверном снижении количества гепатоцитов, на фоне возрастания митотического индекса.

Морфометрические показатели внутриклеточной регенерации, такие как повышение двухъядерных гепатоцитов, площадь гепатоцитов (только у старых лабораторных животных), ядерно-цитоплазматический индекс обусловленный увеличением площади ядра гепатоцитов также были повышены. Также у обеих возрастных групп отмечено увеличение апоптотического индекса по сравнению с интактными животными.

3.2.6. Морфометрические показатели печени на 7-е сутки после трансплантации ММСК у зрелых и старых мышей с субтотальной резекцией печени

При анализе данных морфометрических показателей печени у зрелых лабораторных животных на седьмые сутки на фоне субтотальной резекции печени после трансплантации ММСК выявлено повышение массы печени на 20,83% ($2,03 \pm 0,16$, $p < 0,05$), увеличение митотического индекса на 27,53% ($5,76 \pm 0,49$, $p < 0,05$). Было отмечено достоверное увеличение площади ядра гепатоцитов на 20,89% ($76,63 \pm 4,92$, $p < 0,05$) без существенных отличий показателей площади цитоплазмы гепатоцитов, площади самих гепатоцитов и их количества от данных контрольной подгруппы. Соответственно увеличился ядерно-цитоплазматический индекс на 32,08% ($0,38 \pm 0,02$, $p < 0,05$). В то же время было отмечено увеличение количества двухъядерных гепатоцитов на мм^2 на 22,80% ($393,90 \pm 23,23$, $p < 0,05$) и снижение апоптотического индекса на 24,28% ($0,94 \pm 0,07$, $p < 0,05$) по сравнению с данными контрольной подгруппы (таблица 3.3.23).

Таблица 3.3.23

Морфометрические показатели печени на 7-е сутки после трансплантации ММСК у зрелых мышей с субтотальной резекцией печени, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	ММСК
Масса печени, г	$1,68 \pm 0,11^1$	$2,03 \pm 0,16^2$
Количество гепатоцитов на 1 мм^2	$1\ 427,71 \pm 116,98$	$1\ 485,14 \pm 116,20$
Площадь гепатоцитов, мкм^2	$286,41 \pm 22,44$	$275,14 \pm 24,16$
Площадь ядра гепатоцитов, мкм^2	$63,39 \pm 5,12^1$	$76,63 \pm 4,92^{1,2}$

Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм ²	223,03±17,97	204,37±22,80
ЯЦИ	0,29±0,02 ¹	0,38±0,02 ^{1,2}
Количество двухъядерных гепатоцитов на мм ²	320,77±10,64 ¹	393,90±23,23 ^{1,2}
МИ ‰	4,51±0,47 ¹	5,76±0,49 ^{1,2}
АИ ‰	1,25±0,09 ¹	0,94±0,07 ^{1,2}

Примечание: ¹ – отличие от интактных зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$; ² – отличие от контрольной подгруппы зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

На седьмые сутки у старых лабораторных животных на фоне субтотальной резекции после трансплантации ММСК в отличие от зрелых лабораторных животных не выявлено достоверного увеличения количества гепатоцитов и митотического индекса. Было установлено увеличение площади ядра гепатоцитов на 20,83% ($88,17 \pm 6,58$, $p < 0,05$) и соответственно, ядерно-цитоплазматического индекса на 22,85% ($0,39 \pm 0,01$, $p < 0,05$) без достоверных отличий площади гепатоцитов и площади цитоплазмы гепатоцитов от данных контрольной подгруппы. Вместе с тем отмечено увеличение количества двухъядерных гепатоцитов на 24,19% ($379,71 \pm 35,33$, $p < 0,05$), снижение апоптотического индекса на 21,31% ($1,42 \pm 0,12$, $p < 0,05$) и повышение массы печени на 21,73% ($1,40 \pm 0,10$, $p < 0,05$) по сравнению с показателями контрольной подгруппы (таблица 3.3.24).

Таблица 3.3.24

Морфометрические показатели печени на 7-е сутки после трансплантации ММСК у старых мышей с субтотальной резекцией печени, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	ММСК
Масса печени, г	1,15±0,09 ¹	1,40±0,10 ^{1,2}
Количество гепатоцитов на 1 мм ²	1 009,57±101,14 ¹	980,86±97,59 ¹
Площадь гепатоцитов, мкм ²	348,19±28,36 ¹	352,31±33,73 ¹
Площадь ядра гепатоцитов, мкм ²	72,97±5,91 ¹	88,17±6,58 ^{1,2}
Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм ²	227,13±15,37	224,73±19,86
ЯЦИ	0,32±0,02 ¹	0,39±0,01 ^{1,2}
Количество двухъядерных гепатоцитов на мм ²	305,74±22,52 ¹	379,71±35,33 ^{1,2}

МИ ‰	1,50±0,10 ¹	1,57±0,12 ¹
АИ ‰	1,81±0,17 ¹	1,42±0,12 ^{1,2}

Примечание: ¹ – отличие от интактных старых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$; ² – отличие от контрольной подгруппы старых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

Таким образом, на седьмые сутки у зрелых лабораторных животных на фоне субтотальной резекции печени после трансплантации ММСК регистрируется активация клеточной регенерации печени (повышение митотического индекса) (рисунок 3.4) и внутриклеточной регенерации (увеличение количества двухъядерных гепатоцитов и ядерно-цитоплазматического индекса, за счет увеличения площади ядра гепатоцитов) (рисунок 3.5). В то время как у старых лабораторных животных эффект от трансплантации ММСК проявляется лишь активацией внутриклеточной регенерации. В данной возрастной группе было выявлено увеличение количества двухъядерных гепатоцитов, ядерно-цитоплазматического индекса и площади ядер гепатоцитов в отличии от контрольной подгруппы. В то же время обеих возрастных группах в ответ на трансплантацию ММСК отмечено повышение массы печени и снижение апоптотического индекса (рисунок 3.6) по сравнению с контрольной подгруппой лабораторных животных.

Митотический индекс после трансплантации ММСК на 7-е сутки у зрелых и старых мышей с субтотальной резекцией печени

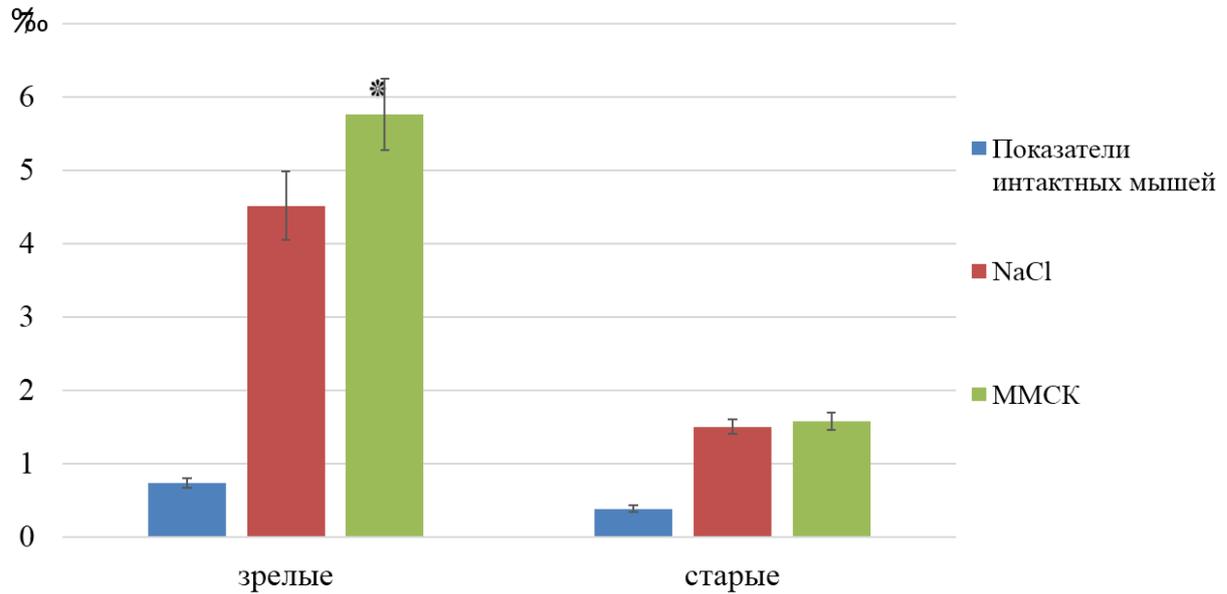


Рисунок 3.4.

Зрелые и старые мыши на 7-е сутки после субтотальной резекции на фоне трансплантации ММСК

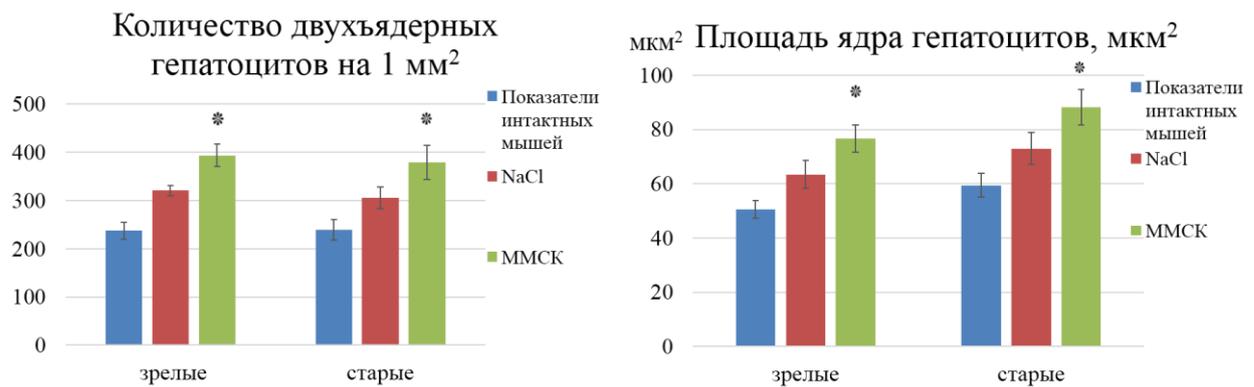


Рисунок 3.5.

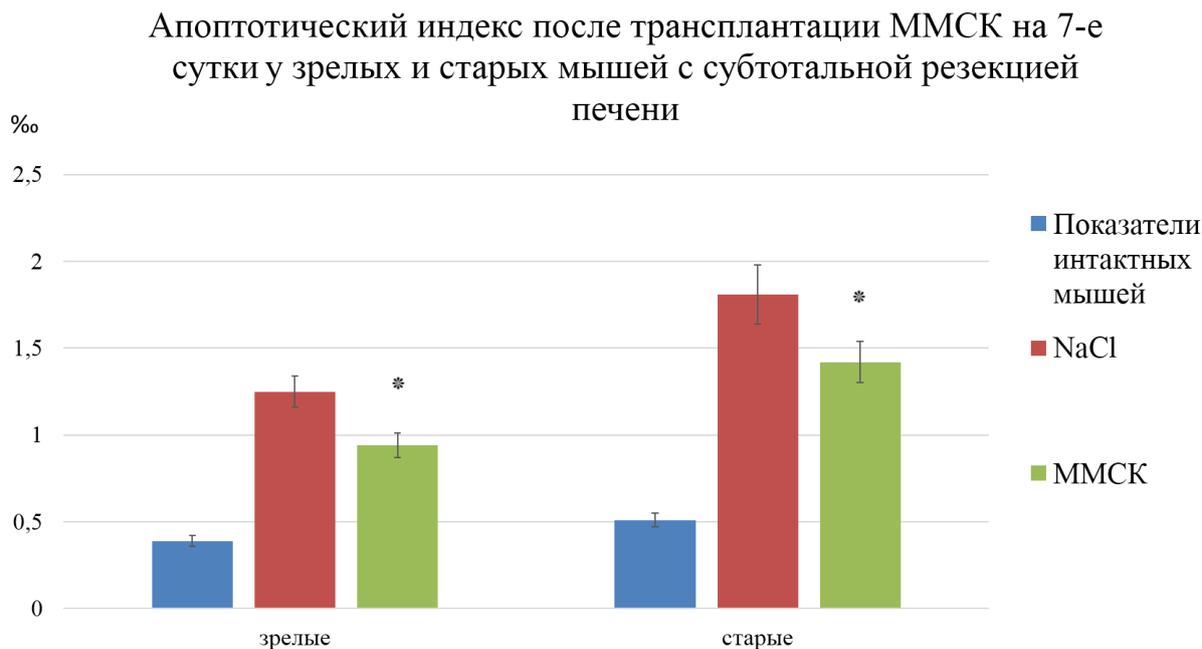


Рисунок 3.6.

Часть IV. Биохимические и морфометрические показатели после трансплантации ММСК у зрелых и старых мышей с токсическим гепатитом

Для того, чтобы оценить функцию печени зрелых и старых мышей в условиях токсического воздействия CCl_4 после трансплантации ММСК производилось определение биохимических и морфометрических показателей печени.

В этом исследовании изучался уровень таких биохимических показателей периферической крови как общий белок, альбумин, фибриноген, мочевины, глюкоза, общий билирубин, активность аланинаминотрансферазы, аспаратаминотрансферазы, щелочной фосфатазы. При гистологическом исследовании препаратов печени производилось определение следующих показателей: количество гепатоцитов на единицу площади, площадь гепатоцитов, площадь ядра гепатоцитов, площадь цитоплазмы гепатоцитов, ядерно-цитоплазматический индекс, количество двухъядерных гепатоцитов, митотический индекс, апоптотический индекс.

4.1. Биохимические показатели периферической крови после трансплантации ММСК у зрелых и старых мышей с токсическим гепатитом

4.1.1. Биохимические показатели периферической крови зрелых и старых мышей на 1-е сутки после введения CCl_4

При анализе биохимических показателей периферической крови зрелых лабораторных животных на первые сутки после введения CCl_4 выявлено увеличение общего билирубина на 55,14% ($15,14 \pm 1,09$, $p < 0,05$). Отмечено повышение активности АСТ на 114,18% ($211,03 \pm 14,55$, $p < 0,05$), АЛТ на 158,33% ($213,90 \pm 15,20$, $p < 0,05$), щелочной фосфатазы на 82,40% ($122,89 \pm 9,21$, $p < 0,05$), а также отмечено уменьшение глюкозы на 29,92% ($4,28 \pm 0,40$, $p < 0,05$) по сравнению с данными интактной группы. Показатели содержания в периферической крови общего белка, альбумина, мочевины и фибриногена достоверно не отличались от данных интактных лабораторных животных (таблица 3.4.1).

Таблица 3.4.1

Биохимические показатели периферической крови зрелых мышей на 1-е сутки после введения CCl_4 , $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	CCl_4
Общий белок, г/л	$69,37 \pm 3,20$	$60,15 \pm 5,68$
Альбумин, г/л	$30,03 \pm 2,83$	$25,71 \pm 2,19$
Мочевина, ммоль/л	$5,76 \pm 1,28$	$5,11 \pm 0,34$
Глюкоза, ммоль/л	$6,10 \pm 0,57$	$4,28 \pm 0,40^1$
Общий билирубин, мкмоль/л	$9,76 \pm 1,15$	$15,14 \pm 1,09^1$
АСТ, Ед/л	$98,53 \pm 8,42$	$211,03 \pm 14,55^1$
АЛТ, Ед/л	$82,80 \pm 5,11$	$213,90 \pm 15,20^1$
Щел. фосфатаза, Ед/л	$67,37 \pm 4,03$	$122,89 \pm 9,21^1$
Фибриноген, г/л	$3,20 \pm 0,20$	$2,87 \pm 0,20$

Примечание: ¹ – отличие от интактных зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

Анализируя биохимические показатели крови старых лабораторных животных на первые сутки после введения CCl_4 установлено увеличение общего

билирубина на 61,22% ($16,24 \pm 1,54$, $p < 0,05$). Также при анализе показателей периферической крови отмечено увеличение активности АСТ на 129,72% ($235,99 \pm 21,06$, $p < 0,05$), АЛТ на 169,14% ($249,95 \pm 16,59$, $p < 0,05$) и щелочной фосфатазы на 93,44% ($152,08 \pm 11,73$, $p < 0,05$) и снижение уровня глюкозы на 35,69% ($3,81 \pm 0,33$, $p < 0,05$) по сравнению с данными интактных животных. Содержание общего белка, альбумина, мочевины и фибриногена достоверно не отличалось от изучаемых показателей в интактной группе (таблица 3.4.2).

Таблица 3.4.2

Биохимические показатели периферической крови старых мышей на 1-е сутки после введения CCl_4 , $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	CCl_4
Общий белок, г/л	$73,67 \pm 5,52$	$64,54 \pm 5,72$
Альбумин, г/л	$26,76 \pm 2,21$	$24,24 \pm 2,43$
Мочевина, ммоль/л	$6,20 \pm 0,43$	$5,79 \pm 0,47$
Глюкоза, ммоль/л	$5,93 \pm 0,36$	$3,81 \pm 0,33^1$
Общий билирубин, мкмоль/л	$10,07 \pm 0,46$	$16,24 \pm 1,54^1$
АСТ, Ед/л	$102,73 \pm 7,83$	$235,99 \pm 21,06^1$
АЛТ, Ед/л	$92,87 \pm 7,19$	$249,95 \pm 16,59^1$
Щел. фосфатаза, Ед/л	$78,61 \pm 5,82$	$152,08 \pm 11,73^1$
Фибриноген, г/л	$3,8 \pm 0,23$	$3,50 \pm 0,26$

Примечание: ¹ – отличие от интактных старых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

Таким образом, на первые сутки после введения четыреххлористого углерода у зрелых и старых лабораторных животных отмечается изменение биохимических показателей периферической крови увеличение уровня общего билирубина, уменьшение содержания глюкозы. Также выявлено в обеих возрастных группах возрастание активности АСТ и АЛТ, что свидетельствует о наличии цитолиза гепатоцитов. У зрелых и старых лабораторных животных в это время зарегистрировано увеличение активности щелочной фосфатазы.

4.1.2. Биохимические показатели на 1-е сутки после трансплантации ММСК у зрелых и старых мышей с токсическим гепатитом

При рассмотрении биохимических показателей периферической крови зрелых лабораторных животных на первые сутки после введения CCl_4 на фоне введения ММСК не обнаружено достоверных отличий от данных контрольной подгруппы (таблица 3.4.3).

Таблица 3.4.3

Биохимические показатели периферической крови на 1-е сутки после трансплантации ММСК у зрелых мышей с токсическим гепатитом, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	ММСК
Общий белок, г/л	60,15±5,68	62,08±5,45
Альбумин, г/л	25,71±2,19	26,40±2,73
Мочевина, ммоль/л	5,11±0,34	5,31±0,41
Глюкоза, ммоль/л	4,28±0,40 ¹	4,41±0,36 ¹
Общий билирубин, мкмоль/л	15,14±1,09 ¹	14,81±0,59 ¹
АСТ, Ед/л	211,03±14,55 ¹	212,44±12,56 ¹
АЛТ, Ед/л	213,90±15,20 ¹	203,76±11,52 ¹
Щел. фосфатаза, Ед/л	122,89±9,21 ¹	120,68±9,79 ¹
Фибриноген, г/л	2,87±0,20	2,97±0,20

Примечание: ¹ – отличие от интактных зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

При изучении биохимических показателей периферической крови старых лабораторных животных на первые сутки после введения CCl_4 совместно с трансплантацией ММСК не обнаружено достоверных отличий от данных контрольной подгруппы (таблица 3.4.4).

Таблица 3.4.4

Биохимические показатели периферической крови на 1-е сутки после трансплантации ММСК у старых мышей с токсическим гепатитом, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	ММСК
Общий белок, г/л	64,54±5,72	66,24±4,98
Альбумин, г/л	24,24±2,43	23,54±3,12
Мочевина, ммоль/л	5,79±0,47	5,60±0,83
Глюкоза, ммоль/л	3,81±0,33 *	3,91±0,29 *
Общий билирубин,	16,24±1,54 *	16,73±1,58 *

мкмоль/л		
АСТ, Ед/л	235,99±21,06 *	239,14±24,00 *
АЛТ, Ед/л	249,95±16,59 *	254,94±17,80 *
Щел. фосфатаза, Ед/л	152,08±11,73 *	144,95±12,30 *
Фибриноген, г/л	3,50±0,26	3,58±0,23

Примечание: ¹ – отличие от интактных старых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

Исходя из вышеизложенного было отмечено, что на первые сутки на фоне введения четыреххлористого углерода после трансплантации ММСК зрелым и старым лабораторным животным не выявлено различий между биохимическими показателями периферической крови контрольной и исследуемой подгруппами.

4.1.3. Биохимические показатели периферической крови зрелых и старых мышей на 3-и сутки после введения CCl_4

При исследовании биохимических показателей периферической крови зрелых лабораторных животных на третьи сутки после введения CCl_4 было выявлено уменьшение содержания общего белка на 28,33% ($48,96 \pm 3,39$, $p < 0,05$), альбуминов на 33,49% ($20,51 \pm 1,59$, $p < 0,05$), фибриногена на 28,38% ($2,34 \pm 0,18$, $p < 0,05$) и глюкозы на 25,81% ($4,25 \pm 0,36$, $p < 0,05$). Отмечено увеличение активности АСТ на 75,36% ($170,55 \pm 11,13$, $p < 0,05$), АЛТ на 105,18% ($166,46 \pm 10,36$, $p < 0,05$), щелочной фосфатазы на 60,87% ($106,73 \pm 9,58$, $p < 0,05$) и повышение уровня общего билирубина на 33,15% ($11,85 \pm 0,90$, $p < 0,05$) по сравнению с данными интактной группы. В показателях уровня мочевины достоверных различий в сравнении с данными интактных лабораторных животных не выявлено (таблица 3.4.5).

Таблица 3.4.5

Биохимические показатели периферической крови зрелых мышей на 3-и сутки после введения CCl_4 , $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	CCl_4
Общий белок, г/л	$68,31 \pm 3,93$	$48,96 \pm 3,39^1$

Альбумин, г/л	30,84±4,25	20,51±1,59 ¹
Мочевина, ммоль/л	6,21±0,87	5,33±0,48
Глюкоза, ммоль/л	5,73±0,69	4,25±0,36 ¹
Общий билирубин, мкмоль/л	8,90±1,14	11,85±0,90 ¹
АСТ, Ед/л	97,26±8,47	170,55±11,13 ¹
АЛТ, Ед/л	81,13±8,66	166,46±10,36 ¹
Щел. Фосфатаза, Ед/л	66,34±5,24	106,73±9,58 ¹
Фибриноген, г/л	3,27±0,18	2,34±0,18 ¹

Примечание: ¹ – отличие от интактных зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

При оценке биохимических показателей периферической крови старых лабораторных животных на третьи сутки после введения CCl_4 выявлено увеличение общего билирубина на 35,54% ($13,61 \pm 1,09$, $p < 0,05$). В то же время было установлено увеличение активности АСТ на 76,64% ($180,85 \pm 11,76$, $p < 0,05$), АЛТ на 116,17% ($210,95 \pm 12,18$, $p < 0,05$) и щелочной фосфатазы на 59,33% ($125,46 \pm 10,07$, $p < 0,05$), уменьшение глюкозы на 27,37% ($4,28 \pm 0,34$, $p < 0,05$), снижение общего белка на 31,30% ($50,14 \pm 4,04$, $p < 0,05$), альбуминов на 34,54% ($17,86 \pm 1,71$, $p < 0,05$), фибриногена на 36,73% ($2,49 \pm 0,19$, $p < 0,05$) по сравнению с данными контрольной подгруппы. Данные мочевины достоверно неотличимы от данных интактных лабораторных животных (таблица 3.4.6).

Таблица 3.4.6

Биохимические показатели периферической крови старых мышей на 3-и сутки после введения CCl_4 , $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	CCl_4
Общий белок, г/л	73,07±4,56	50,14±4,04 ¹
Альбумин, г/л	27,29±1,93	17,86±1,71 ¹
Мочевина, ммоль/л	6,46±0,67	6,08±0,53
Глюкоза, ммоль/л	5,89±0,41	4,28±0,34 ¹
Общий билирубин, мкмоль/л	10,04±0,41	13,61±1,09 ¹
АСТ, Ед/л	102,39±9,52	180,85±11,76 ¹
АЛТ, Ед/л	97,59±7,38	210,95±12,18 ¹
Щел. Фосфатаза, Ед/л	78,74±6,04	125,46±10,07 ¹
Фибриноген, г/л	3,93±0,29	2,49±0,19 ¹

Примечание: ¹ – отличие от интактных старых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

Таким образом, на третьи сутки после введения четыреххлористого углерода зрелым и старым лабораторным животным выявлены изменения биохимических показателей периферической крови. Сохраняется повышенное содержание общего билирубина. Содержание глюкозы, как и на первые сутки, было достоверно ниже показателей интактных лабораторных животных. Отмечено снижение содержания общего белка, альбуминов и фибриногена в обеих возрастных группах по сравнению с интактными животными. Активность АСТ, АЛТ, щелочной фосфатазы существенно превышало данные интактных животных.

4.1.4. Биохимические показатели периферической крови на 3-и сутки после трансплантации ММСК у зрелых и старых мышей с токсическим гепатитом

При исследовании биохимических показателей периферической крови зрелых лабораторных животных на третьи сутки на фоне введения CCl_4 после трансплантации ММСК обнаружено уменьшение активности АСТ на 21,31% ($134,21 \pm 12,03$, $p < 0,05$), АЛТ на 27,16% ($121,25 \pm 7,76$, $p < 0,05$) по сравнению с данными контрольной подгруппы. Не выявлено достоверных отличий общего белка, альбумина, фибриногена, мочевины, глюкозы, общего билирубина и активности щелочной фосфатазы от данных контрольной подгруппы (таблица 3.4.7).

Таблица 3.4.7

Биохимические показатели периферической крови на 3-и сутки после трансплантации ММСК у зрелых мышей с токсическим гепатитом, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	ММСК
Общий белок, г/л	$48,96 \pm 3,39^1$	$51,85 \pm 4,98^1$
Альбумин, г/л	$20,51 \pm 1,59^1$	$22,05 \pm 2,03^1$
Мочевина, ммоль/л	$5,33 \pm 0,48$	$5,63 \pm 0,45$
Глюкоза, ммоль/л	$4,25 \pm 0,36^1$	$4,35 \pm 0,48^1$

Общий билирубин, мкмоль/л	11,85±0,90 ¹	11,30±0,85 ¹
АСТ, Ед/л	170,55±11,13 ¹	134,21±12,03 ^{1,2}
АЛТ, Ед/л	166,46±10,36 ¹	121,25±7,76 ^{1,2}
Щел. фосфатаза, Ед/л	106,73±9,58 ¹	97,0±9,10 ¹
Фибриноген, г/л	2,34±0,18 ¹	2,49±0,21 ¹

Примечание: ¹ – отличие от интактных зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$; ² – отличие от контрольной подгруппы зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

При анализе биохимических показателей периферической крови старых лабораторных животных на третьи сутки после совместного введения CCl_4 с ММСК выявляется уменьшение активности АСТ на 22,0% (141,06±15,63, $p < 0,05$) и АЛТ на 24,53% (159,21±12,62, $p < 0,05$) по сравнению с данными контрольной подгруппы. Показатели общего белка, альбумина, фибриногена, мочевины, глюкозы, общего билирубина и щелочной фосфатазы достоверно неотличимы от данных контрольной подгруппы (таблица 3.4.8).

Таблица 3.4.8

Биохимические показатели периферической крови на 3-и сутки после трансплантации ММСК старых мышей с токсическим гепатитом, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	ММСК
Общий белок, г/л	50,14±4,04 ¹	51,56±3,74 ¹
Альбумин, г/л	17,86±1,71 ¹	18,53±1,50 ¹
Мочевина, ммоль/л	6,08±0,53	5,54±0,44
Глюкоза, ммоль/л	4,28±0,34 ¹	4,40±0,35 ¹
Общий билирубин, мкмоль/л	13,61±1,09 ¹	13,35±1,28 ¹
АСТ, Ед/л	180,85±11,76 ¹	141,06±15,63 ^{1,2}
АЛТ, Ед/л	210,95±12,18 ¹	159,21±12,62 ^{1,2}
Щел. фосфатаза, Ед/л	125,46±10,07 ¹	119,09±10,74 ¹
Фибриноген, г/л	2,49±0,19 ¹	2,63±0,20 ¹

Примечание: ¹ – отличие от интактных старых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$; ² – отличие от контрольной подгруппы старых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

Отсюда следует, что на третьи сутки на фоне введения четыреххлористого углерода после трансплантации ММСК у зрелых и старых лабораторных животных отмечена достоверная разница в биохимических показателях цитолиза гепатоцитов относительно контрольной подгруппы. В обеих изучаемых возрастных группах активность АЛТ и АСТ была существенно меньше, чем у лабораторных животных без введения ММСК (рисунок 3.7).

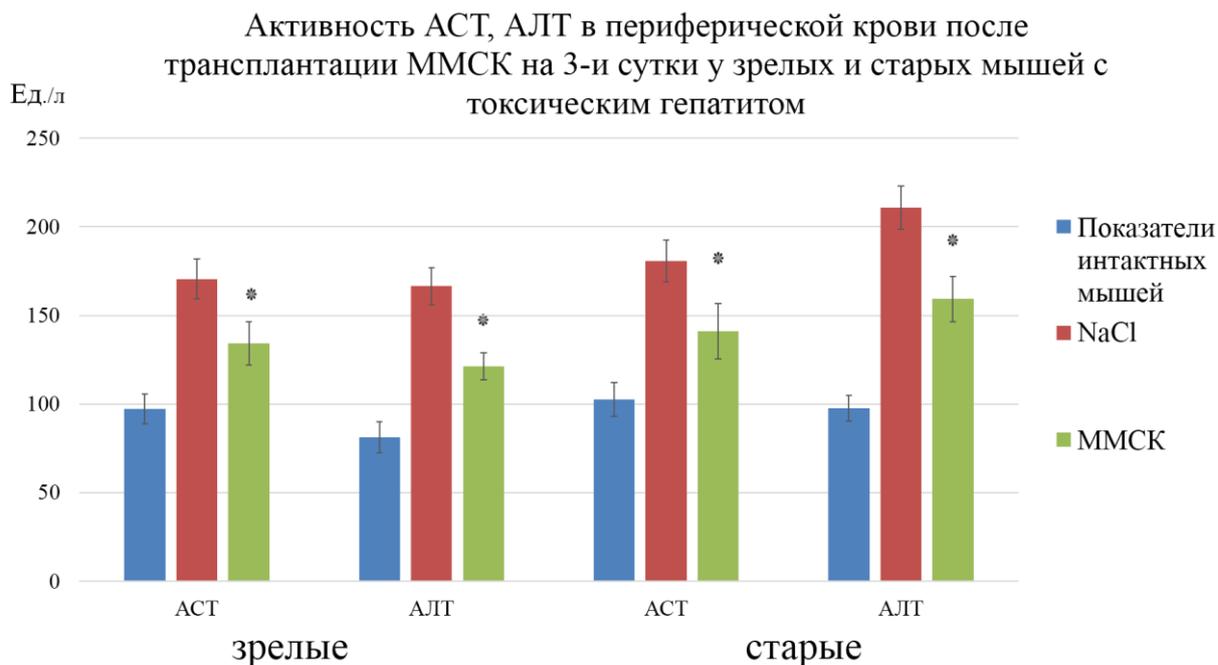


Рисунок 3.7.

4.1.5. Биохимические показатели периферической крови зрелых и старых мышей на 7-е сутки после введения CCl_4

При рассмотрении биохимических показателей периферической крови зрелых лабораторных животных на седьмые сутки после введения CCl_4 выявляется увеличение общего билирубина на 26,85% ($11,89 \pm 0,67$, $p < 0,05$), активности АСТ на 32,42% ($138,45 \pm 9,29$, $p < 0,05$), АЛТ на 73,15% ($154,50 \pm 9,85$, $p < 0,05$) и щелочной фосфатазы на 44,08% ($91,20 \pm 7,98$, $p < 0,05$). При этом было установлено снижение уровня общего белка на 23,00% ($51,18 \pm 4,58$, $p < 0,05$), альбуминов на 27,62% ($22,74 \pm 1,86$, $p < 0,05$) и фибриногена на 25,89% ($2,37 \pm 0,20$,

$p < 0,05$) по сравнению с данными интактной группы. Уровень глюкозы достиг значений интактных животных. Достоверных изменений в данных мочевины по сравнению с данными интактных лабораторных животных не выявлено (таблица 3.4.9).

Таблица 3.4.9

Биохимические показатели периферической крови зрелых мышей на 7-е сутки после введения CCl_4 , $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	CCl_4
Общий белок, г/л	$66,46 \pm 4,36$	$51,18 \pm 4,58^1$
Альбумин, г/л	$31,41 \pm 3,38$	$22,74 \pm 1,86^1$
Мочевина, ммоль/л	$6,11 \pm 0,61$	$6,41 \pm 0,49$
Глюкоза, ммоль/л	$6,44 \pm 0,62$	$5,90 \pm 0,50$
Общий билирубин, мкмоль/л	$9,37 \pm 0,65$	$11,89 \pm 0,67^1$
АСТ, Ед/л	$104,56 \pm 9,07$	$138,45 \pm 9,29^1$
АЛТ, Ед/л	$89,23 \pm 4,43$	$154,50 \pm 9,85^1$
Щел. фосфатаза, Ед/л	$63,30 \pm 4,00$	$91,20 \pm 7,98^1$
Фибриноген, г/л	$3,20 \pm 0,23$	$2,37 \pm 0,20^1$

Примечание: ¹ – отличие от интактных зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

При изучении биохимических показателей периферической крови старых лабораторных животных на седьмые сутки после введения CCl_4 было выявлено увеличение общего билирубина на 28,97% ($13,06 \pm 1,34$, $p < 0,05$). Вместе с тем установлено увеличение активности АСТ на 42,09% ($143,78 \pm 10,28$, $p < 0,05$), АЛТ на 85,83% ($177,60 \pm 12,98$, $p < 0,05$) и щелочной фосфатазы на 36,37% ($103,04 \pm 9,10$, $p < 0,05$). Отмечено уменьшение общего белка на 25,18% ($54,05 \pm 4,80$, $p < 0,05$), альбумина на 30,28% ($19,06 \pm 1,71$, $p < 0,05$), глюкозы на 22,01% ($4,51 \pm 0,44$, $p < 0,05$), снижение фибриногена на 34,21% ($2,50 \pm 0,17$, $p < 0,05$), по сравнению с интактной группой. Значение мочевины достоверно не отличалось от данных интактных лабораторных животных (таблица 3.4.10).

Таблица 3.4.10

Биохимические показатели периферической крови старых мышей на 7-е сутки
после введения CCl_4 , $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	CCl_4
Общий белок, г/л	72,24±4,32	54,05±4,80 ¹
Альбумин, г/л	27,34±1,99	19,06±1,71 ¹
Мочевина, ммоль/л	6,27±0,54	6,53±0,60
Глюкоза, ммоль/л	5,79±0,44	4,51±0,44 ¹
Общий билирубин, мкмоль/л	10,13±0,62	13,06±1,34 ¹
АСТ, Ед/л	101,19±8,41	143,78±10,28 ¹
АЛТ, Ед/л	95,57±7,36	177,60±12,98 ¹
Щел. фосфатаза, Ед/л	75,56±5,11	103,04±9,10 ¹
Фибриноген, г/л	3,80±0,26	2,50±0,17 ¹

Примечание: ¹ – отличие от интактных старых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

Полученные данные свидетельствуют, что на седьмые сутки после введения четыреххлористого углерода зрелым и старым лабораторным животным отмечены отличия в изучаемых показателях периферической крови. Так, у зрелых лабораторных животных показатели глюкозы восстановились до значений интактной группы. В то время как у старых лабораторных животных данный показатель не восстановился. Уровень общего белка, альбуминов и фибриногена в обеих возрастных группах понижен по сравнению с интактными животными. Остальные изучаемые показатели (общий билирубин, активность щелочной фосфатазы, АСТ и АЛТ) в обеих возрастных группах были достоверно выше значений нормы.

4.1.6. Биохимические показатели периферической крови на 7-е сутки после трансплантации ММСК у зрелых и старых мышей с токсическим гепатитом

При исследовании биохимических показателей периферической крови зрелых лабораторных животных на седьмые сутки после введения CCl_4 на фоне введения ММСК обнаружено уменьшение активности АСТ на 25,19%

(103,58±9,73, $p<0,05$), АЛТ на 28,00% (111,24±10,45, $p<0,05$), щелочной фосфатазы 29,28% (64,50±6,23, $p<0,05$) и повышение содержания общего белка 21,49% (62,18±4,38, $p<0,05$), альбуминов 25,56% (28,55±1,89, $p<0,05$) и фибриногена на 22,89% (2,91±0,21, $p<0,05$) по сравнению с контрольной подгруппой. В то же время показатели общего белка, альбуминов, активность АСТ и щелочной фосфатазы достигли значений интактной подгруппы. При этом достоверных отличий мочевины, глюкозы, от данных контрольной подгруппы не установлено (таблица 3.4.11).

Таблица 3.4.11

Биохимические показатели периферической крови на 7-е сутки после трансплантации ММСК у зрелых мышей с токсическим гепатитом, $M\pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	ММСК
Общий белок, г/л	51,18±4,58 ¹	62,18±4,38 ²
Альбумин, г/л	22,74±1,86 ¹	28,55±1,89 ²
Мочевина, ммоль/л	6,41±0,49	6,16±0,53
Глюкоза, ммоль/л	5,90±0,50	5046±0,35
Общий билирубин, мкмоль/л	11,89±0,67 ¹	11,13±0,93 ¹
АСТ, Ед/л	138,45±9,29 ¹	103,58±9,73 ²
АЛТ, Ед/л	154,50±9,85 ¹	111,24±10,45 ^{1,2}
Щел. фосфатаза, Ед/л	91,20±7,98 ¹	64,50±6,23 ²
Фибриноген, г/л	2,37±0,20 ¹	2,91±0,21 ²

Примечание: ¹ – отличие от интактных зрелых лабораторных животных, достоверно с $p<0,05$; ² – отличие от контрольной подгруппы зрелых лабораторных животных, достоверно с $p<0,05$.

При изучении биохимических показателей периферической крови старых лабораторных животных на седьмые сутки на фоне введения CCl_4 после трансплантации ММСК выявлено уменьшение активности АСТ на 24,93% (107,93±10,73, $p<0,05$) и АЛТ на 29,16% (125,81±9,82, $p<0,05$), увеличение фибриногена на 21,14% (3,03±0,22, $p<0,05$), по сравнению с данными контрольной подгруппы. В то же время один из изучаемых показателей цитолиза – активность

АСТ восстановился и существенно не отличался от данных интактных лабораторных животных. При анализе содержания мочевины, глюкозы, общего билирубина, активности щелочной фосфатазы отмечено отсутствие значимых различий с данными контрольной подгруппы. В данной возрастной группе показатели мочевины не отличались от значений нормы как после моделирования токсического гепатита, так и на фоне введения ММСК (таблица 3.4.12).

Таблица 3.4.12

Биохимические показатели периферической крови на 7-е сутки после трансплантации ММСК у старых мышей с токсическим гепатитом, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	ММСК
Общий белок, г/л	54,05±4,80 ¹	57,39±4,52 ¹
Альбумин, г/л	19,06±1,71 ¹	20,81±1,92 ¹
Мочевина, ммоль/л	6,53±0,60	6,26±0,53
Глюкоза, ммоль/л	4,51±0,44 ¹	4,55±0,38 ¹
Общий билирубин, мкмоль/л	13,06±1,34 ¹	12,76±1,18 ¹
АСТ, Ед/л	143,78±10,28 ¹	107,93±10,73 ²
АЛТ, Ед/л	177,60±12,98 ¹	125,81±9,82 ^{1,2}
Щел. фосфатаза, Ед/л	103,04±9,10 ¹	94,58±7,12 ¹
Фибриноген, г/л	2,50±0,17 ¹	3,03±0,22 ^{1,2}

Примечание: ¹ – отличие от интактных старых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$; ² – отличие от контрольной подгруппы старых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

Таким образом, на седьмые сутки на фоне введения четыреххлористого углерода после трансплантации ММСК у зрелых и старых лабораторных животных обнаружены изменения со стороны показателей периферической крови. В обеих возрастных группах в ответ на трансплантацию ММСК произошло восстановление активности АСТ до значений интактных животных. При этом активность АЛТ также существенно снизилось относительно контрольной подгруппы, но не достигло значений нормы. У зрелых лабораторных животных в отличие от старых выявлено снижение активности щелочной фосфатазы и увеличение фибриногена, общего белка, альбуминов до значений интактных

лабораторных животных (рисунок 3.8, 3.9). В то время как у старых лабораторных животных показатель активности щелочной фосфатазы достоверно не отличался от данных в контрольной подгруппе, а показатель фибриногена увеличился по сравнению с данными контроля (рисунок 3.10). Остальные изучаемые показатели углеводного, пигментного обменов в обеих возрастных группах на фоне введения ММСК не отличались от значений в контрольной подгруппе.

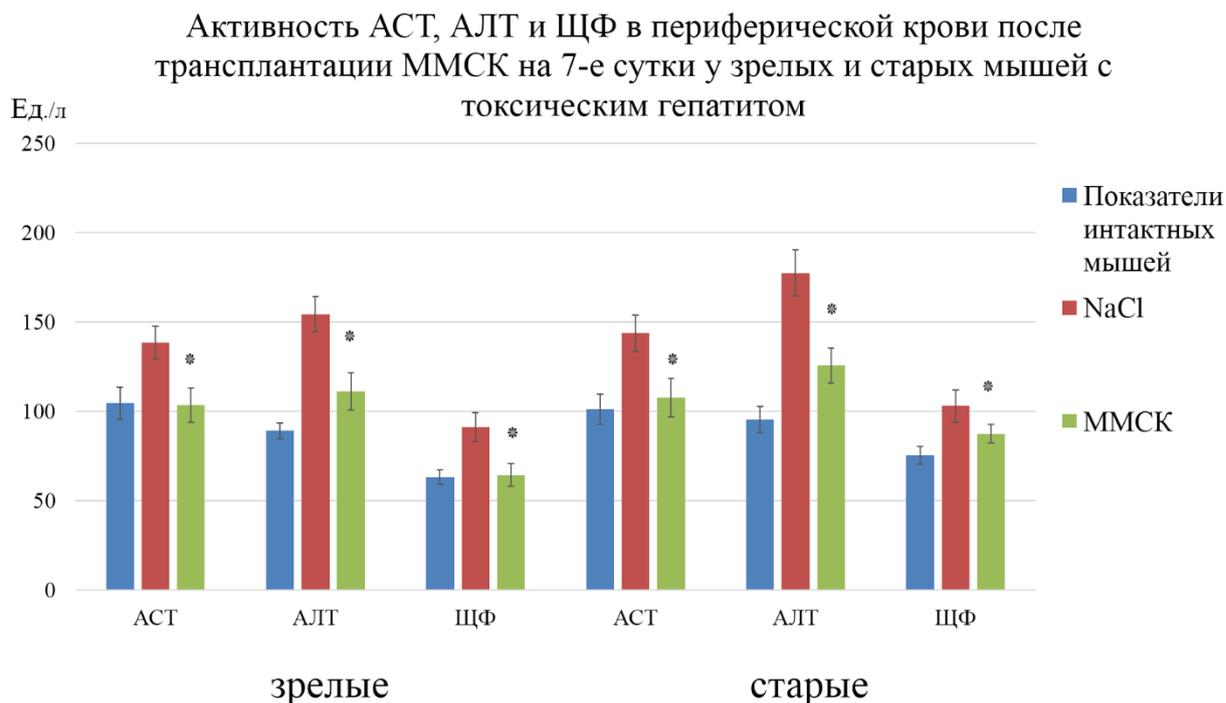


Рисунок 3.8.

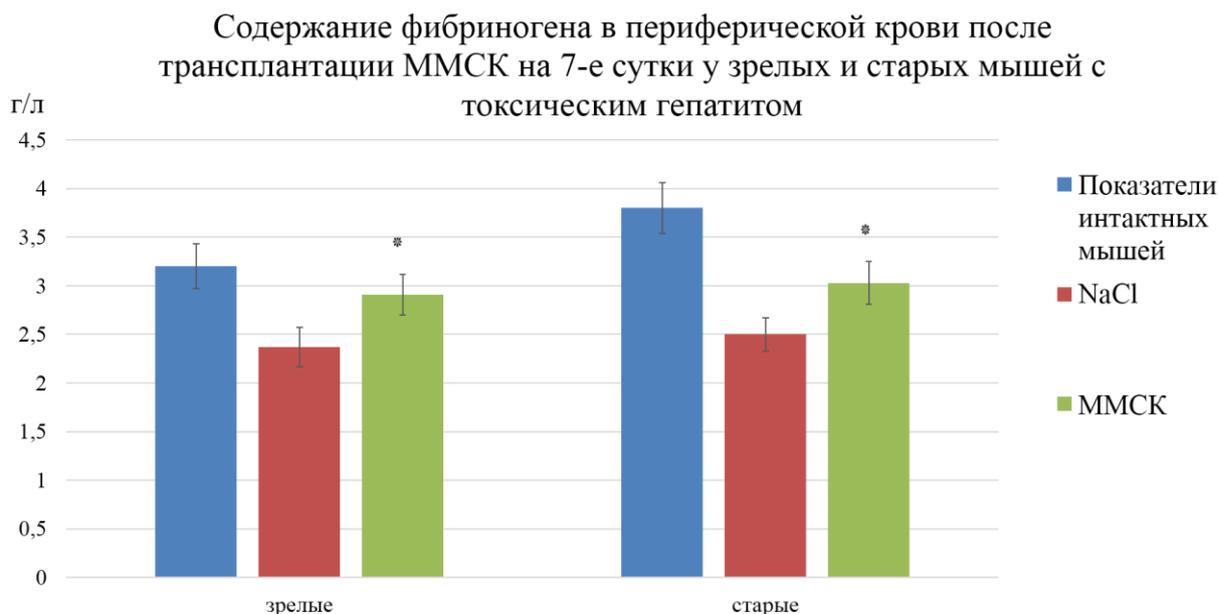


Рисунок 3.9.

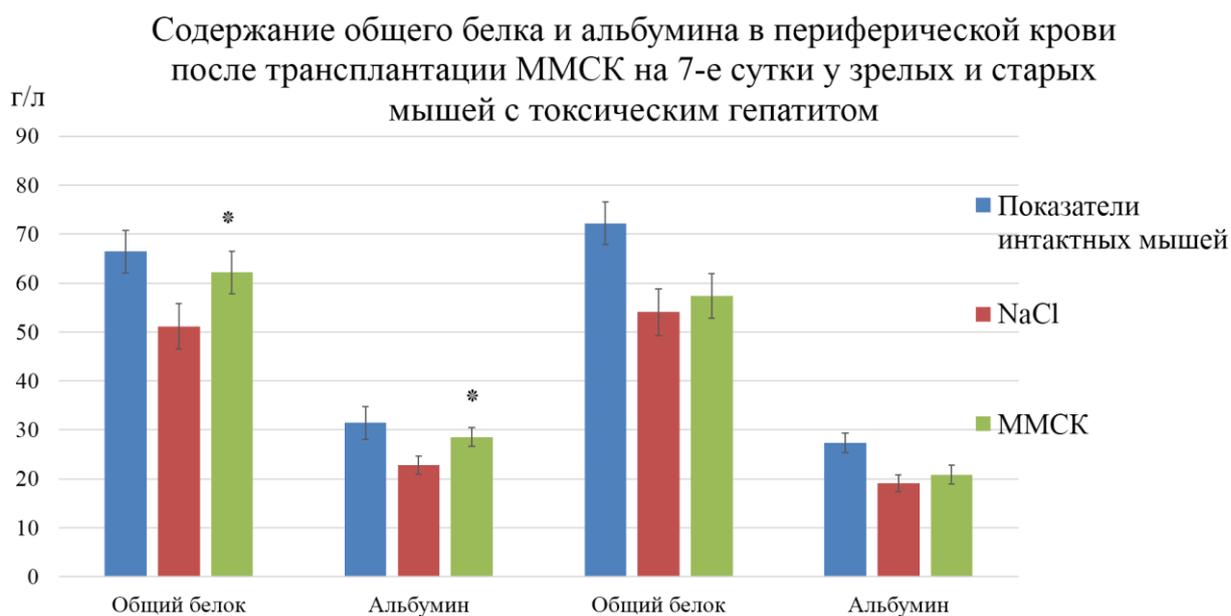


Рисунок 3.10.

4.2. Морфометрические показатели печени после трансплантации ММСК зрелых и старых мышей с токсическим гепатитом

4.2.1. Морфометрические показатели печени зрелых и старых мышей на 1-е сутки после введения CCl_4

При изучении морфометрических показателей печени зрелых лабораторных животных на первые сутки после введения CCl_4 было отмечено увеличение количества гепатоцитов на 31,46% ($2060,71 \pm 121,10$, $p < 0,05$), митотического индекса на 2230,21% ($17,74 \pm 2,13$, $p < 0,05$). Площадь ядра гепатоцитов достоверно не отличалась от данных интактной группы, в то время как площадь гепатоцитов уменьшилась на 29,62% ($186,43 \pm 12,43$, $p < 0,05$), за счет уменьшения площади цитоплазмы гепатоцитов на 38,03% ($132,83 \pm 11,71$, $p < 0,05$), при этом ядерно-цитоплазматический индекс увеличился на 70,74% ($0,41 \pm 0,04$, $p < 0,05$). Также было установлено увеличение количества двухъядерных гепатоцитов на 255,75% ($830,43 \pm 52,65$, $p < 0,05$), повышение апоптотического индекса на 1088,15% ($4,87 \pm 0,36$, $p < 0,05$) по сравнению с данными интактных животных (таблица 3.4.13).

Таблица 3.4.13

Морфометрические показатели печени зрелых мышей на 1-е сутки после введения CCl_4 , $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	CCl_4
Количество гепатоцитов на 1 мм^2	$1\ 567,57 \pm 102,9$	$2\ 060,71 \pm 121,10^1$
Площадь гепатоцитов, мкм^2	$264,9 \pm 22,16$	$186,43 \pm 12,43^1$
Площадь ядра гепатоцитов, мкм^2	$50,57 \pm 3,80$	$53,60 \pm 3,60$
Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм^2	$214,33 \pm 20,44$	$132,83 \pm 11,71^1$
ЯЦИ	$0,24 \pm 0,03$	$0,41 \pm 0,04^1$
Количество двухъядерных гепатоцитов на мм^2	$233,43 \pm 12,20$	$830,43 \pm 52,65^1$
МИ ‰	$0,76 \pm 0,07$	$17,74 \pm 2,13^1$
АИ ‰	$0,41 \pm 0,05$	$4,87 \pm 0,36^1$

Примечание: ¹ – отличие от интактных зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

Изучая морфометрические показатели печени следует отметить, что у старых лабораторных животных на первые сутки после введения CCl_4 в отличие от зрелых лабораторных животных на фоне увеличения митотического индекса на 1776,33% ($7,59 \pm 0,50$, $p < 0,05$) не происходит увеличения количества гепатоцитов,

ранее выявленное у зрелых лабораторных животных. Анализируя площадь гепатоцитов отмечено уменьшение данного показателя на 28,31% ($212,99 \pm 19,27$, $p < 0,05$). Это обусловлено уменьшением площади цитоплазмы гепатоцитов на 36,81% ($151,34 \pm 15,72$, $p < 0,05$). При это площадь ядра гепатоцитов оставалась без изменений относительно интактных животных. Указанные изменения привели к увеличению ЯЦИ на 67,81% ($0,41 \pm 0,03$, $p < 0,05$) по сравнению с данными интактных животных. Было отмечено увеличение двухъядерных гепатоцитов на 329,71% ($1035,86 \pm 92,41$, $p < 0,05$), апоптотического индекса 1006,44% ($5,64 \pm 0,45$, $p < 0,05$) по сравнению с интактной группой (таблица 3.4.14).

Таблица 3.4.14

Морфометрические показатели печени старых мышей на 1-е сутки после введения CCl_4 , $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	CCl_4
Количество гепатоцитов на 1 мм^2	$1\ 323,14 \pm 111,31$	$1\ 475,29 \pm 127,18$
Площадь гепатоцитов, мкм^2	$297,10 \pm 21,14$	$212,99 \pm 19,27^1$
Площадь ядра гепатоцитов, мкм^2	$57,60 \pm 5,37$	$61,64 \pm 4,26$
Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм^2	$239,93 \pm 16,42$	$151,34 \pm 15,72^1$
ЯЦИ	$0,25 \pm 0,02$	$0,41 \pm 0,03^1$
Количество двухъядерных гепатоцитов на мм^2	$241,06 \pm 21,38$	$1035,86 \pm 92,41^1$
МИ %	$0,40 \pm 0,05$	$7,59 \pm 0,50^1$
АИ %	$0,51 \pm 0,04$	$5,64 \pm 0,45^1$

Примечание: ¹ – отличие от интактных старых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

Исходя из вышеописанного было отмечено, что на первые сутки у зрелых лабораторных животных на фоне введения четыреххлористого углерода значительное увеличение митотического индекса, количества гепатоцитов, в то время как у старых лабораторных животных при повышенном митотическом индексе содержание гепатоцитов достоверно не отличалось от данных в интактной группе. При описании состояния внутриклеточной регенерации в обеих возрастных группах было установлено увеличение количества

двухъядерных гепатоцитов, а также ядерно-цитоплазматического индекса. Изменение ЯЦИ обусловлено уменьшением площади цитоплазмы гепатоцитов, при достоверно неизменившейся площади ядра гепатоцитов относительно показателей интактных лабораторных животных. В то же время было отмечено увеличение апоптотического индекса в обеих возрастных группах по сравнению с интактными группами.

4.2.2. Морфометрические показатели печени на 1-е сутки после трансплантации ММСК у зрелых и старых мышей с токсическим гепатитом

При анализе данных морфометрических показателей печени зрелых лабораторных животных на первые сутки на фоне введения CCl_4 после трансплантации ММСК не было выявлено достоверных изменений по сравнению с показателями контрольной подгруппы (таблица 3.4.15).

Таблица 3.4.15

Морфометрические показатели печени на 1-е сутки после трансплантации ММСК у зрелых мышей с токсическим гепатитом, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	ММСК
Количество гепатоцитов на 1 мм ²	2 060,71±121,10 ¹	2 010,0±109,43 ¹
Площадь гепатоцитов, мкм ²	186,43±12,43 ¹	180,79±11,98 ¹
Площадь ядра гепатоцитов, мкм ²	53,60±3,60	52,29±3,90
Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм ²	132,83±11,71 ¹	128,50±11,49 ¹
ЯЦИ	0,41±0,04 ¹	0,41±0,04 ¹
Количество двухъядерных гепатоцитов на мм ²	830,43±52,65 ¹	807,43±56,65 ¹
МИ ‰	17,74±2,13 ¹	18,97±1,54 ¹
АИ ‰	4,87±0,36 ¹	4,66±0,47 ¹

Примечание: ¹ – отличие от интактных зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

При рассмотрении морфометрических показателей печени старых лабораторных животных на первые сутки на фоне введения CCl_4 после

трансплантации ММСК не обнаружилось достоверных изменений по сравнению с показателями контрольной подгруппы (таблица 3.4.16).

Таблица 3.4.16

Морфометрические показатели печени на 1-е сутки после трансплантации ММСК у старых мышей с токсическим гепатитом, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	ММСК
Количество гепатоцитов на 1 мм ²	1 475,29±127,18	1 441,71±101,76
Площадь гепатоцитов, мкм ²	212,99±19,27 ¹	223,09±18,39 ¹
Площадь ядра гепатоцитов, мкм ²	61,64±4,26	59,50±5,77
Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм ²	151,34±15,72 ¹	163,59±14,24 ¹
ЯЦИ	0,41±0,03 ¹	0,36±0,02 ¹
Количество двухъядерных гепатоцитов на мм ²	1035,86±92,41 ¹	1018,00±99,14 ¹
МИ ‰	7,59±0,50 ¹	7,26±0,58 ¹
АИ ‰	5,64±0,45 ¹	5,30±0,40 ¹

Примечание: ¹ – отличие от интактных старых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

Итак, на первые сутки на фоне введения четыреххлористого углерода после трансплантации ММСК у зрелых и старых лабораторных животных не обнаружено различий изучаемых морфометрических показателей между показателями контрольной и опытной подгрупп.

4.2.3. Морфометрические показатели печени зрелых и старых мышей на 3-и сутки после введения CCl₄

Так же, как и на первые, на третьи сутки после введения CCl₄ отмечается изменение морфометрических показателей печени зрелых лабораторных животных. Было отмечено достоверное увеличение количества гепатоцитов на 24,73% (1902,86±125,55, $p < 0,05$) в связи с увеличением митотического индекса на 1962,02% (15,20±1,20, $p < 0,05$) относительно результатов интактных животных. В данной возрастной категории площадь ядра гепатоцитов осталась без достоверных отличий от интактных животных, но ядерно-цитоплазматический

индекс увеличился на 61,96% ($0,35 \pm 0,03$, $p < 0,05$) посредством уменьшения площади цитоплазмы гепатоцитов на 31,40% ($151,76 \pm 17,96$, $p < 0,05$) и площади гепатоцитов на 23,90% ($205,03 \pm 19,60$, $p < 0,05$). В то же время было обнаружено увеличение количества двухъядерных гепатоцитов на 102,38% ($474,43 \pm 46,08$, $p < 0,05$) по сравнению с данными интактной группы. Было зарегистрировано увеличение апоптотического индекса 763,33% ($3,7 \pm 0,31$, $p < 0,05$) по сравнению с интактной группой (таблица 3.4.17).

Таблица 3.4.17

Морфометрические показатели печени зрелых мышей на 3-и сутки после введения CCl_4 , $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	CCl_4
Количество гепатоцитов на 1 мм ²	1 525,57±101,06	1 902,86±125,55 ¹
Площадь гепатоцитов, мкм ²	267,54±19,24	205,03±19,60 ¹
Площадь ядра гепатоцитов, мкм ²	48,40±3,57	53,27±2,32
Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм ²	219,14±7,12	151,76±17,96 ¹
ЯЦИ	0,22±0,02	0,35±0,03 ¹
Количество двухъядерных гепатоцитов на мм ²	234,43±19,63	474,43±46,08 ¹
МИ ‰	0,74±0,06	15,20±1,20 ¹
АИ ‰	0,43±0,04	3,7±0,31 ¹

Примечание: ¹ – отличие от интактных зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

При анализе морфометрических показателей печени старых лабораторных животных на третьи сутки после введения CCl_4 сохраняется повышенная митотическая активность на 1662,96% ($6,80 \pm 0,51$, $p < 0,05$). При этом количество гепатоцитов, так же, как и на 1-е сутки существенно не отличалось от интактных лабораторных животных. В данной возрастной группе было выявлено увеличение ядерно-цитоплазматического индекса на 92,38% ($0,45 \pm 0,03$, $p < 0,05$), которое было обусловлено не только уменьшением площади цитоплазмы гепатоцитов на 36,77% ($157,50 \pm 15,14$, $p < 0,05$), но и за счет увеличения площади ядра гепатоцитов на 20,35% ($70,54 \pm 5,34$, $p < 0,05$). В то же время было отмечено уменьшение

площади гепатоцитов на 26,62% ($228,04 \pm 17,47$, $p < 0,05$). При анализе количества двухъядерных гепатоцитов отмечено, что данный показатель был увеличен на 204,62% ($736,14 \pm 56,37$, $p < 0,05$) по сравнению с данными интактной группы. Было выявлено увеличение апоптотического индекса 794,12% ($4,34 \pm 0,39$, $p < 0,05$) по сравнению с интактной группой (таблица 3.4.18).

Таблица 3.4.18

Морфометрические показатели печени старых мышей на 3-и сутки после введения CCl_4 , $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	CCl_4
Количество гепатоцитов на 1 мм ²	1 301,14±124,98	1 431,29±116,33
Площадь гепатоцитов, мкм ²	310,77±28,80	228,04±17,47 ¹
Площадь ядра гепатоцитов, мкм ²	58,61±3,61	70,54±5,34 ¹
Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм ²	244,18±22,62	157,50±15,14 ¹
ЯЦИ	0,23±0,02	0,45±0,03 ¹
Количество двухъядерных гепатоцитов на мм ²	241,66±19,08	736,14±56,37 ¹
МИ ‰	0,39±0,04	6,80±0,51 ¹
АИ ‰	0,49±0,04	4,34±0,39 ¹

Примечание: ¹ – отличие от интактных старых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

Таким образом, на третьи сутки у старых лабораторных животных на фоне введения четыреххлористого углерода в отличие от зрелых лабораторных животных выявлено увеличение площади ядра гепатоцитов. При этом в обеих возрастных группах показатели клеточной регенерации (митотический индекс) и внутриклеточной регенерации (площадь гепатоцитов, площадь цитоплазмы гепатоцитов, количество двухъядерных гепатоцитов, ядерно-цитоплазматический индекс) так же, как и на 1-е сутки достоверно отличались от интактных лабораторных животных. В то же время было отмечено увеличение апоптотического индекса в обеих возрастных группах по сравнению с интактными группами

4.2.4 Морфометрические показатели печени на 3-и сутки после трансплантации ММСК у зрелых и старых мышей с токсическим гепатитом

При рассмотрении морфометрических показателей печени зрелых лабораторных животных на третьи сутки на фоне введения CCl_4 после трансплантации ММСК отмечается достоверное увеличение митотического индекса на 31,58% ($20,00 \pm 2,09$, $p < 0,05$). При этом было отмечено повышение ядерно-цитоплазматического индекса на 40,36% ($0,50 \pm 0,03$, $p < 0,05$) на фоне увеличения площади ядра гепатоцитов на 23,33% ($65,70 \pm 2,97$, $p < 0,05$). Вместе с тем было установлено увеличение количества двухъядерных гепатоцитов на 36,46% ($647,43 \pm 51,39$, $p < 0,05$). Также было выявлено снижение апоптотического индекса на 28,96% ($2,63 \pm 0,28$, $p < 0,05$) по сравнению с данными контрольной подгруппы. Достоверных данных об изменении числа гепатоцитов, площади гепатоцитов и площади цитоплазмы гепатоцитов по сравнению с показателями контрольной подгруппы не обнаружено (таблица 3.4.19).

Таблица 3.4.19

Морфометрические показатели печени на 3-и сутки после трансплантации ММСК у зрелых мышей с токсическим гепатитом, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	ММСК
Количество гепатоцитов на 1 мм ²	1 902,86±125,55 ¹	2 032,14±144,69 ¹
Площадь гепатоцитов, мкм ²	205,03±19,60 ¹	197,59±15,79 ¹
Площадь ядра гепатоцитов, мкм ²	53,27±2,32	65,70±2,97 ^{1,2}
Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм ²	151,76±17,96 ¹	131,89±12,82 ¹
ЯЦИ	0,35±0,03 ¹	0,50±0,03 ^{1,2}
Количество двухъядерных гепатоцитов на мм ²	474,43±46,08 ¹	647,43±51,39 ^{1,2}
МИ ‰	15,20±1,20 ¹	20,00±2,09 ^{1,2}
АИ ‰	3,7±0,31 ¹	2,63±0,28 ^{1,2}

Примечание: ¹ – отличие от интактных зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$; ² – отличие от контрольной подгруппы зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

На третьи сутки изучения морфометрических показателей печени старых лабораторных животных на фоне введения CCl_4 после трансплантации ММСК отмечается достоверное увеличение площади ядра гепатоцитов на 26,97% ($89,57 \pm 6,11$, $p < 0,05$) без достоверного изменения показателей площади цитоплазмы гепатоцитов и площади самих гепатоцитов. Соответственно увеличился ядерно-цитоплазматический индекс на 38,35% ($0,62 \pm 0,04$, $p < 0,05$). В то же время было отмечено увеличение количества двухъядерных гепатоцитов на 27,29% ($937,00 \pm 70,29$, $p < 0,05$). В то же время было выявлено снижение апоптотического индекса на 23,36% ($3,33 \pm 0,29$, $p < 0,05$) по сравнению с данными контрольной подгруппы. Не обнаружено достоверных данных об изменении количества гепатоцитов и митотического индекса по сравнению с показателями контрольной подгруппы (таблица 3.4.20).

Таблица 3.4.20

Морфометрические показатели печени на 3-и сутки после трансплантации ММСК у старых мышей с токсическим гепатитом, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	ММСК
Количество гепатоцитов на 1 мм ²	1 431,29±116,33	1 476,71±126,33
Площадь гепатоцитов, мкм ²	228,04±17,47 ¹	235,00±20,80 ¹
Площадь ядра гепатоцитов, мкм ²	70,54±5,34 ¹	89,57±6,11 ^{1,2}
Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм ²	157,50±15,14 ¹	145,43±15,63 ¹
ЯЦИ	0,45±0,03 ¹	0,62±0,04 ^{1,2}
Количество двухъядерных гепатоцитов на мм ²	736,14±56,37 ¹	937,00±70,29 ^{1,2}
МИ ‰	6,80±0,51 ¹	6,96±0,45 ¹
АИ ‰	4,34±0,39 ¹	3,33±0,29 ^{1,2}

Примечание: ¹ – отличие от интактных старых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$; ² – отличие от контрольной подгруппы старых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

Исходя из вышеописанного следует, что 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) (рисунок 3.11), так и внутриклеточной регенерации (площадь ядра гепатоцитов, ядерно-цитоплазматический индекс, количество двухъядерных гепатоцитов) (рисунок 3.12). В то время как у старых лабораторных животных было достоверно отмечено изменение морфологических показателей, характеризующих только повышение активности внутриклеточной регенерации (площадь ядра гепатоцитов, ядерно-цитоплазматический индекс, количество двухъядерных гепатоцитов). В обеих возрастных группах выявлено снижение апоптотического индекса (рисунок 3.13) на фоне трансплантации ММСК по сравнению с данными контрольной подгруппы.

Митотический индекс после трансплантации ММСК на 3-и сутки у зрелых и старых мышей с токсическим гепатитом

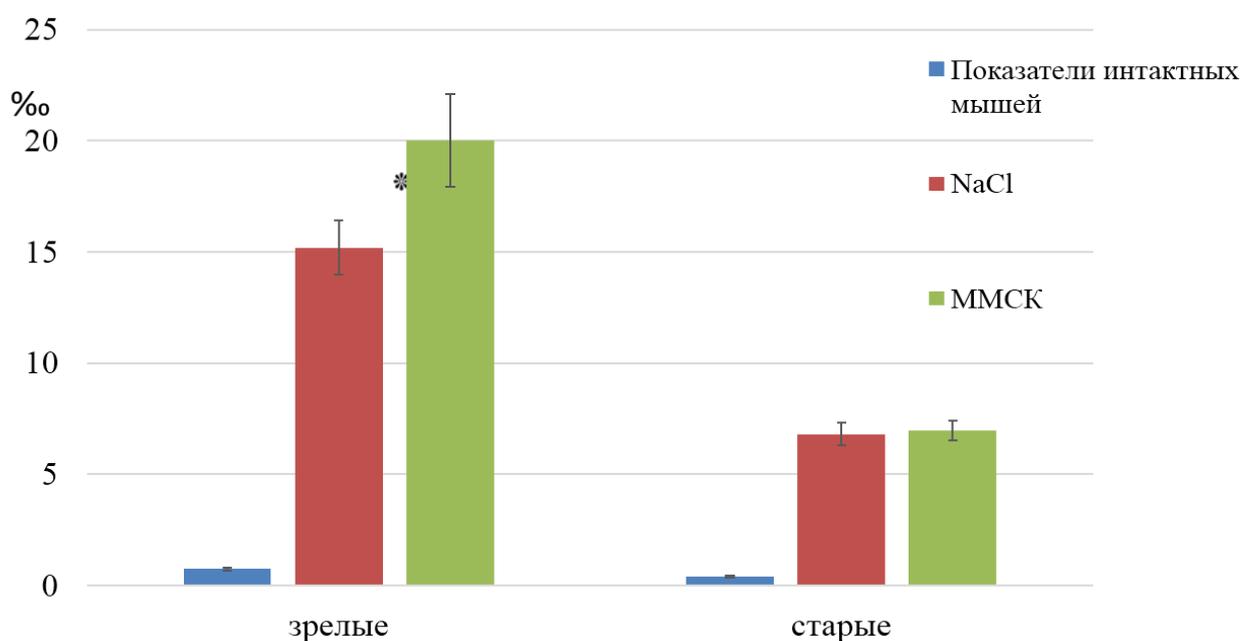


Рисунок 3.11.

Зрелые и старые мыши на 3-е сутки после введения CCl_4 на фоне трансплантации ММСК

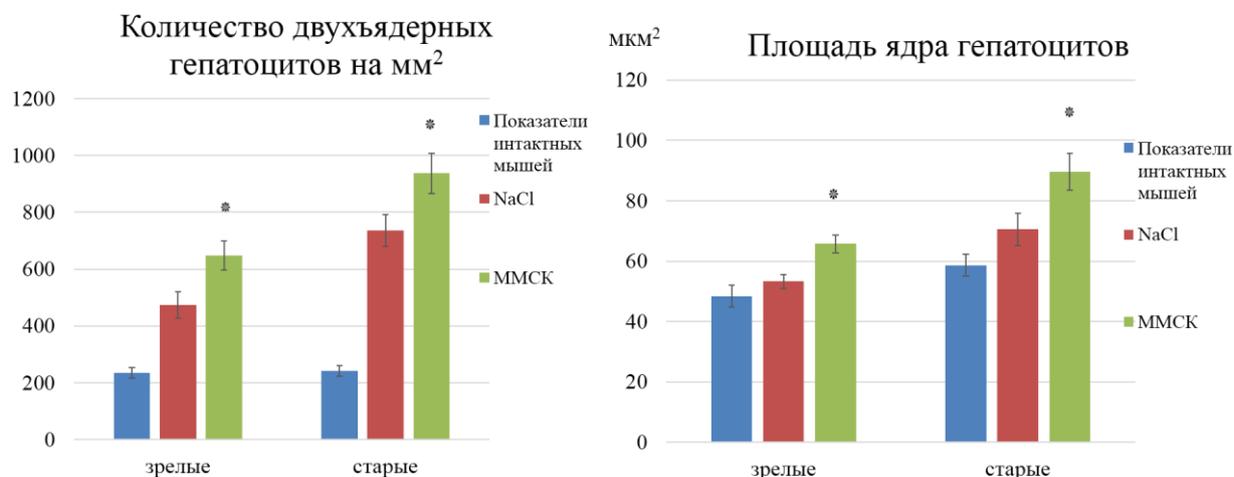


Рисунок 3.12.

Апoptотический индекс после трансплантации МСК на 3-и сутки у зрелых и старых мышей с токсическим гепатитом

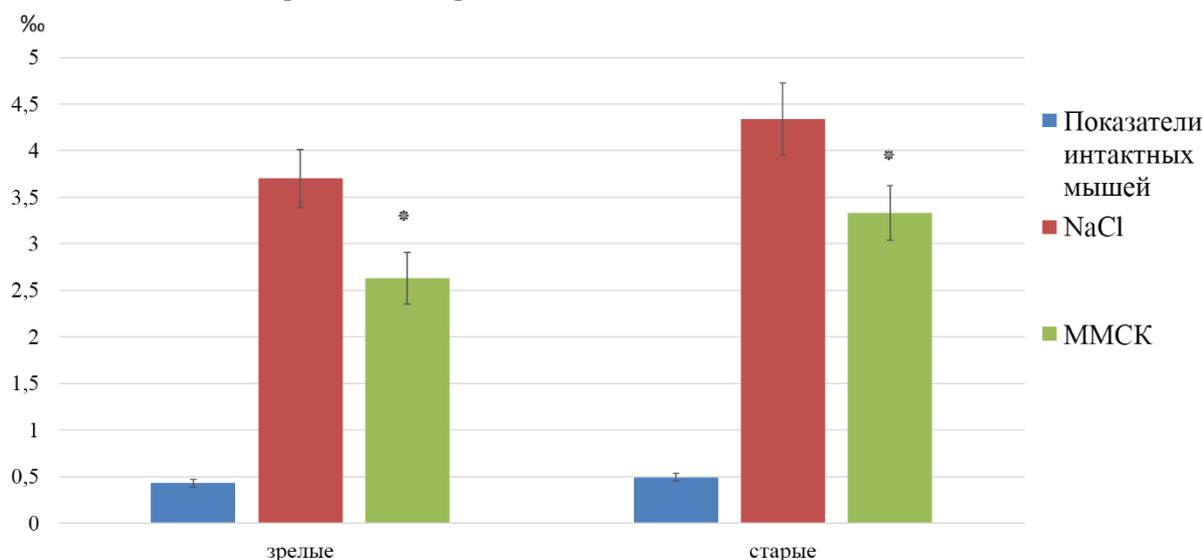


Рисунок 3.13.

4.2.5 Морфометрические показатели печени зрелых и старых мышей на 7-е сутки после введения CCl_4

При анализе морфометрических показателей печени зрелых лабораторных животных на седьмые сутки после введения CCl_4 выявляется увеличение количества гепатоцитов на 21,9% ($1970,71 \pm 139,96$, $p < 0,05$) и митотический индекс

на 2232,03% ($17,06 \pm 1,64$, $p < 0,05$). В то же время было зарегистрировано увеличение площади ядра гепатоцитов на 20,78% ($60,94 \pm 4,68$, $p < 0,05$), ядерно-цитоплазматического индекса на 81,86% ($0,43 \pm 0,04$, $p < 0,05$), на фоне уменьшения площади гепатоцитов на 22,65% ($204,71 \pm 16,27$, $p < 0,05$), площади цитоплазмы гепатоцитов на 32,88% ($143,77 \pm 14,80$, $p < 0,05$). Также было отмечено увеличение количества двухъядерных гепатоцитов на 63,76% ($388,57 \pm 30,94$, $p < 0,05$) по сравнению с данными контрольной подгруппы. Было выявлено увеличение апоптотического индекса 849,28% ($3,74 \pm 0,31$, $p < 0,05$) по сравнению с интактной группой (таблица 3.4.21).

Таблица 3.4.21

Морфометрические показатели печени зрелых мышей на 7-е сутки после введения CCl_4 , $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	CCl_4
Количество гепатоцитов на 1 мм^2	$1\ 538,14 \pm 103,59$	$1\ 970,71 \pm 139,96^1$
Площадь гепатоцитов, мкм^2	$264,67 \pm 20,02$	$204,71 \pm 16,27^1$
Площадь ядра гепатоцитов, мкм^2	$50,46 \pm 3,29$	$60,94 \pm 4,68^1$
Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм^2	$214,21 \pm 19,50$	$143,77 \pm 14,80^1$
ЯЦИ	$0,24 \pm 0,02$	$0,43 \pm 0,04^1$
Количество двухъядерных гепатоцитов на мм^2	$237,29 \pm 18,24$	$388,57 \pm 30,94^1$
МИ %	$0,73 \pm 0,06$	$17,06 \pm 1,64^1$
АИ %	$0,39 \pm 0,03$	$3,74 \pm 0,31^1$

Примечание: ¹ – отличие от интактных зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

На седьмые сутки у старых лабораторных животных после введения CCl_4 количество гепатоцитов оставалось достоверно неотличимым от интактных животных. При этом отмечалось увеличение митотического индекса на 1861,98% ($7,37 \pm 0,40$, $p < 0,05$). Показатель ядерно-цитоплазматического индекса повысился на 104,02% ($0,52 \pm 0,02$, $p < 0,05$) за счет увеличения площади ядра гепатоцитов на 29,26% ($76,80 \pm 6,74$, $p < 0,05$) и уменьшения площади цитоплазмы гепатоцитов на 36,43% ($148,93 \pm 14,02$, $p < 0,05$). Также было установлено уменьшение площади

гепатоцитов на 23,14% ($225,73 \pm 19,00$, $p < 0,05$), увеличение количества двухъядерных гепатоцитов на 96,66% ($471,43 \pm 30,49$, $p < 0,05$) по сравнению с данными контрольной подгруппы. Было зарегистрировано увеличение апоптотического индекса 807,04% ($4,60 \pm 0,31$, $p < 0,05$) по сравнению с интактными лабораторными животными (таблица 3.4.22).

Таблица 3.4.22

Морфометрические показатели печени старых мышей на 7-е сутки после введения CCl_4 , $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	CCl_4
Количество гепатоцитов на 1 мм ²	$1\ 296,29 \pm 119,84$	$1\ 408,86 \pm 117,88$
Площадь гепатоцитов, мкм ²	$293,69 \pm 21,25$	$225,73 \pm 19,00^1$
Площадь ядра гепатоцитов, мкм ²	$59,41 \pm 4,44$	$76,80 \pm 6,74^1$
Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм ²	$234,27 \pm 19,12$	$148,93 \pm 14,02^1$
ЯЦИ	$0,25 \pm 0,02$	$0,52 \pm 0,02^1$
Количество двухъядерных гепатоцитов на мм ²	$239,71 \pm 21,30$	$471,43 \pm 30,49^1$
МИ ‰	$0,38 \pm 0,05$	$7,37 \pm 0,40^1$
АИ ‰	$0,51 \pm 0,04$	$4,60 \pm 0,31^1$

Примечание: ¹ – отличие от интактных старых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

На седьмые сутки у зрелых и старых лабораторных животных сохраняются изменения морфологических показателей, соответствующие изменениям данной возрастной группы на третьи сутки данного исследования. При этом у зрелых животных впервые было установлено увеличение площади ядра гепатоцитов в отличие от интактных животных.

4.2.6 Морфометрические показатели печени на 7-е сутки после трансплантации ММСК у зрелых и старых мышей с токсическим гепатитом

На седьмые сутки на фоне введения CCl_4 после трансплантации ММСК выявлено изменение морфометрических показателей печени зрелых лабораторных животных. Отмечено достоверное увеличение митотического

индекса на 31,99% ($22,51 \pm 1,79$, $p < 0,05$). Вместе с тем площадь гепатоцитов увеличилась на 21,33% ($230,27 \pm 20,72$, $p < 0,05$) и достигла значений интактных животных, а площадь ядра гепатоцитов увеличилась на 35,47% ($82,56 \pm 5,09$, $p < 0,05$), что привело к повышению ядерно-цитоплазматического индекса на 15,72% ($0,56 \pm 0,05$, $p < 0,05$). Количество двухъядерных гепатоцитов также было увеличено на 21,40% ($471,71 \pm 31,96$, $p < 0,05$). В то же время было выявлено снижение апоптотического индекса на 24,81% ($2,81 \pm 0,27$, $p < 0,05$) по сравнению с данными контрольной подгруппы, не достигшее значений интактной группы. Достоверных данных об отличии числа гепатоцитов, площади цитоплазмы гепатоцитов от показателей контрольной подгруппы не установлено (таблица 3.4.23).

Таблица 3.4.23

Морфометрические показатели печени на 7-е сутки после трансплантации ММСК у зрелых мышей с токсическим гепатитом, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	ММСК
Количество гепатоцитов на 1 мм ²	$1\ 970,71 \pm 139,96^1$	$1\ 766,0 \pm 102,0$
Площадь гепатоцитов, мкм ²	$204,71 \pm 16,27^1$	$230,27 \pm 20,72^2$
Площадь ядра гепатоцитов, мкм ²	$60,94 \pm 4,68^1$	$82,56 \pm 5,09^{1,2}$
Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм ²	$143,77 \pm 14,80^1$	$150,24 \pm 16,25^1$
ЯЦИ	$0,43 \pm 0,04^1$	$0,56 \pm 0,05^{1,2}$
Количество двухъядерных гепатоцитов на мм ²	$388,57 \pm 30,94^1$	$471,71 \pm 31,96^{1,2}$
МИ %	$17,06 \pm 1,64^1$	$22,51 \pm 1,79^2$
АИ %	$3,74 \pm 0,31^1$	$2,81 \pm 0,27^{1,2}$

Примечание: ¹ – отличие от интактных зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$; ² – отличие от контрольной подгруппы зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

На седьмые сутки у старых лабораторных животных на фоне введения СС₄ после трансплантации ММСК выявлено достоверное увеличение митотического индекса на 21,51% ($8,96 \pm 0,55$, $p < 0,05$). Было установлено увеличение площади гепатоцитов на 21,95% ($275,29 \pm 21,53$, $p < 0,05$) с достижением значений интактных

животных, площади ядра гепатоцитов на 38,32% ($106,23 \pm 8,13$, $p < 0,05$) и соответственно, ядерно-цитоплазматического индекса на 20,54% ($0,63 \pm 0,05$, $p < 0,05$). Вместе с тем отмечено увеличение количества двухъядерных гепатоцитов на 33,45% ($629,14 \pm 53,80$, $p < 0,05$). Также было зарегистрировано снижение апоптотического индекса на 23,29% ($3,53 \pm 0,34$, $p < 0,05$) по сравнению с данными контрольной подгруппы, не достигшее значений интактной группы. Достоверных данных об изменении числа гепатоцитов, площади цитоплазмы гепатоцитов по сравнению с показателями контрольной подгруппы не отмечено (таблица 3.4.24).

Таблица 3.4.24

Морфометрические показатели печени на 7-е сутки после трансплантации ММСК у старых мышей с токсическим гепатитом, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	ММСК
Количество гепатоцитов на 1 мм ²	$1\ 408,86 \pm 117,88$	$1\ 267,86 \pm 117,88$
Площадь гепатоцитов, мкм ²	$225,73 \pm 19,00^1$	$275,29 \pm 21,53^2$
Площадь ядра гепатоцитов, мкм ²	$76,80 \pm 6,74^1$	$106,23 \pm 8,13^{1,2}$
Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм ²	$148,93 \pm 14,02^1$	$169,06 \pm 13,71^1$
ЯЦИ	$0,52 \pm 0,02^1$	$0,63 \pm 0,05^{1,2}$
Количество двухъядерных гепатоцитов на мм ²	$471,43 \pm 30,49^1$	$629,14 \pm 53,80^{1,2}$
МИ %	$7,37 \pm 0,40^1$	$8,96 \pm 0,55^{1,2}$
АИ %	$4,60 \pm 0,31^1$	$3,53 \pm 0,34^{1,2}$

Примечание: ¹ – отличие от интактных старых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$; ² – отличие от контрольной подгруппы старых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

Полученные данные свидетельствуют, что на седьмые сутки у зрелых и старых лабораторных животных можно отметить увеличение активности клеточной и внутриклеточной регенерации на фоне трансплантации ММСК. При этом у старых лабораторных животных механизмы клеточной регенерации (увеличение митотического индекса) не выявляемые на третьи сутки после введения ММСК в условиях токсического повреждения печени были обнаружены

на седьмые сутки после введения ММСК (рисунок 3.14). В то же время было отмечено снижение апоптотического индекса относительно контрольной подгруппы, не достигшее значений интактных животных (рисунок 3.15).

Митотический индекс после трансплантации ММСК на 7-е сутки у зрелых и старых мыши с токсическим гепатитом

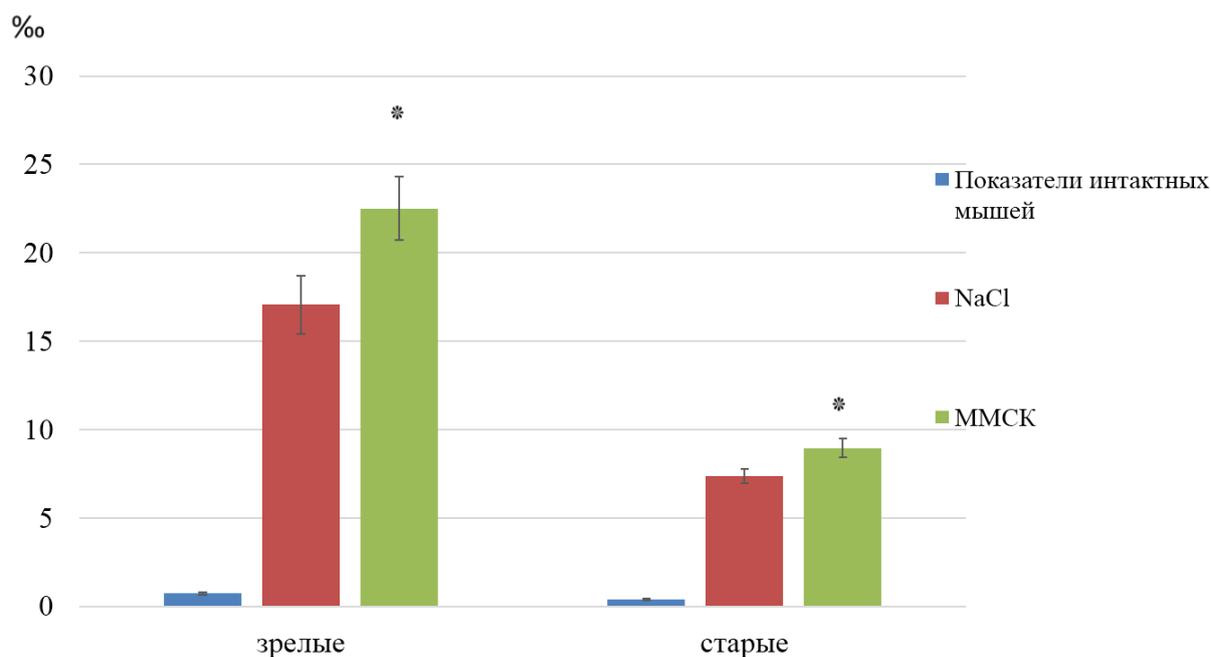
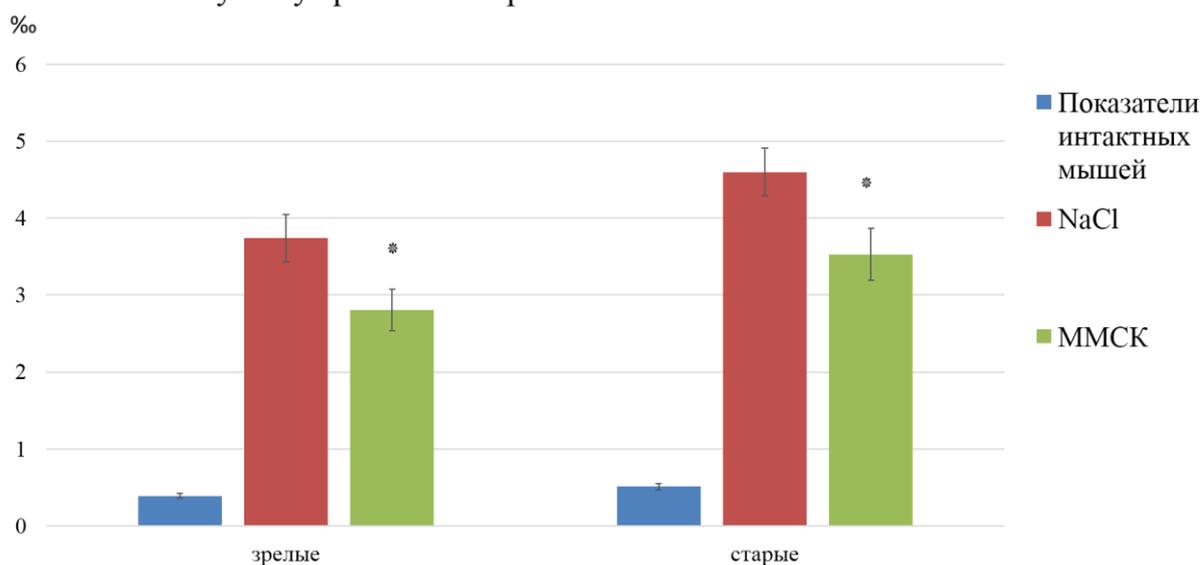


Рисунок 3.14.

Апоптотический индекс после трансплантации ММСК на 7-е сутки у зрелых и старых мышей с токсическим гепатитом



Таким образом, при исследовании морфометрических показателей зрелых и старых лабораторных животных на фоне введения четыреххлористого углерода после трансплантации ММСК были зарегистрированы следующие особенности: у зрелых лабораторных животных в условиях токсического повреждения печени активация клеточной регенерации была отмечена на первые сутки, а у старых лабораторных животных данный механизм установлен только к седьмым суткам на фоне трансплантации плацентарных ММСК. При этом в обеих возрастных группах после введения ММСК изменение показателей внутриклеточной регенерации было отмечено с первых суток исследования.

Анализируя полученные морфометрические показатели после введения ММСК на фоне воздействия субтотальной резекции печени и токсического гепатита, можно подвести итог.

Часть V. Сравнительная характеристика биохимических и морфометрических показателей после трансплантации ММСК зрелых и старых мышей в физиологических условиях, в условиях субтотальной резекции печени и токсического гепатита

Для выявления различий между воздействием субтотальной резекцией печени и токсического гепатита на структуру и функцию печени у обеих возрастных групп было проведено сравнение некоторых показателей при экстремальных воздействиях и после трансплантации ММСК.

Общий белок

В обеих возрастных группах на первые сутки как без введения ММСК, так и после введения клеток уровень общего белка в периферической крови на фоне токсического гепатита остался без достоверных отличий от интактных животных, тогда как на фоне субтотальной резекции печени уровень общего белка в периферической крови был достоверно снижен относительно интактной группы.

На третьи сутки у зрелых, а также на третьи и седьмые сутки у старых лабораторных животных на фоне экстремальных воздействий уровень общего белка в периферической крови как без введения ММСК, так и после введения клеток в равной степени снижен относительно интактных животных. На седьмые сутки у зрелых лабораторных животных на фоне введения ММСК происходит восстановление уровня общего белка в периферической крови при токсическом гепатите (рисунок 3.16). В то же время при субтотальной резекции у зрелых лабораторных животных содержание общего белка в периферической крови остается достоверно ниже чем у интактных животных (таблицы 3.5.1, 3.5.2).

Содержание общего белка (г/л) в периферической крови зрелых мышей,
 $M \pm m, n = 7$

Таблица 3.5.1

Воздействие	Время после воздействия		
	1-е сутки	3-и сутки	7-е сутки
	Без введения ММСК		
Без операции	69,37±3,20	68,31±3,93	66,46±4,36
Резекция печени	51,29±4,81 ¹	50,03±4,82 ¹	44,27±3,62 ¹
CCl ₄	60,15±5,68	48,96±3,39 ¹	51,18±4,58 ¹
	С введение ММСК		
Без операции	69,36±3,85	66,46±4,38	68,87±4,76
Резекция печени	55,20±4,71 ¹	55,61±4,24 ¹	49,63±2,80 ¹
CCl ₄	62,08±5,45	51,85±4,98 ¹	62,18±4,38 ^{2,3}

¹ – отличие от интактных лабораторных животных той же возрастной группы, достоверно с $p < 0,05$; ² – отличие от лабораторных животных с тем же воздействием той же возрастной группы после введения ММСК, достоверно с $p < 0,05$; ³ – отличие от лабораторных животных при резекции печени той же возрастной группы, достоверно с $p < 0,05$;

Содержание общего белка (г/л) в периферической крови старых мышей,
 $M \pm m, n = 7$

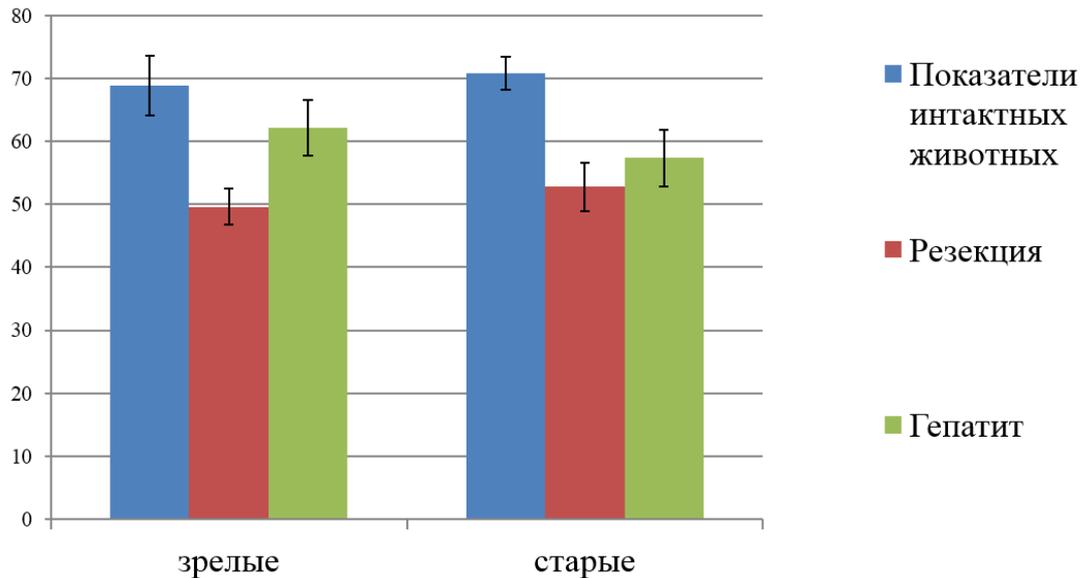
Таблица 3.5.2

Воздействие	Время после воздействия		
	1-е сутки	3-и сутки	7-е сутки
	Без введения ММСК		
Без операции	73,39±4,42	73,07±4,56	72,24±4,32
Резекция печени	52,79±3,64 ¹	47,76±4,48 ¹	47,63±3,77 ¹
CCl ₄	64,54±5,72	50,14±4,04 ¹	54,05±4,80 ¹
	С введение ММСК		
Без операции	74,84±3,17	73,91±3,01	70,83±2,63
Резекция печени	57,56±4,68 ¹	55,34±5,09 ¹	52,77±3,85 ¹
CCl ₄	66,24±4,98	51,56±3,74 ¹	57,39±4,52 ¹

¹ – отличие от интактных лабораторных животных той же возрастной группы, достоверно с $p < 0,05$; ² – отличие от лабораторных животных с тем же воздействием той же возрастной группы после введения ММСК, достоверно с $p < 0,05$; ³ – отличие от лабораторных животных при резекции печени той же возрастной группы, достоверно с $p < 0,05$;

Рисунок 3.16.

Общий белок крови зрелых и старых лабораторных животных на 7 сутки после введения ММСК на фоне экстремальных воздействий



Митотический индекс

В обеих возрастных группах на первые сутки как без введения ММСК, так и после введения клеток митотический индекс на фоне токсического гепатита значительно выше митотического индекса на фоне субтотальной резекции печени. У зрелых лабораторных животных на фоне экстремальных воздействий митотический индекс возрастает больше чем у старых лабораторных животных в тех же условиях. На третьи и седьмые сутки у зрелых и старых лабораторных животных сохраняется преобладание повышенного митотического индекса на фоне токсического гепатита над повышенным митотическим индексом при субтотальной резекции печени как без введения ММСК, так и с введением клеток (рисунок 3.17). При этом митотический индекс на фоне токсического гепатита превышает митотический индекс при субтотальной резекции в равной степени в обеих возрастных группах (таблица 3.5.3, 3.5.4).

Митотический индекс (%) у зрелых мышей, $M \pm m$, $n = 7$

Таблица 3.5.3

Воздействие	Время после воздействия		
	1-е сутки	3-и сутки	7-е сутки
	Без введения ММСК		
Без операции	0,76±0,07	0,74±0,06	0,73±0,06
Резекция печени	0,52±0,03	8,10±0,60 ¹	4,51±0,47 ¹
CCl ₄	17,74±2,13 ^{1,3}	15,20±1,20 ^{1,3}	17,06±1,64 ^{1,3}
	С введение ММСК		
Без операции	0,75±0,05	0,75±0,06	0,76±0,05
Резекция печени	0,54±0,04	7,91±0,58 ¹	5,76±0,49 ^{1,2}
CCl ₄	18,97±1,54 ^{1,3}	20,00±2,09 ^{1,2,3}	22,51±1,79 ^{2,3}

¹ – отличие от интактных лабораторных животных той же возрастной группы, достоверно с $p < 0,05$; ² – отличие от лабораторных животных с тем же воздействием той же возрастной группы после введения ММСК, достоверно с $p < 0,05$; ³ – отличие от лабораторных животных при резекции печени той же возрастной группы, достоверно с $p < 0,05$.

Митотический индекс (%) у старых мышей, $M \pm m$, $n = 7$

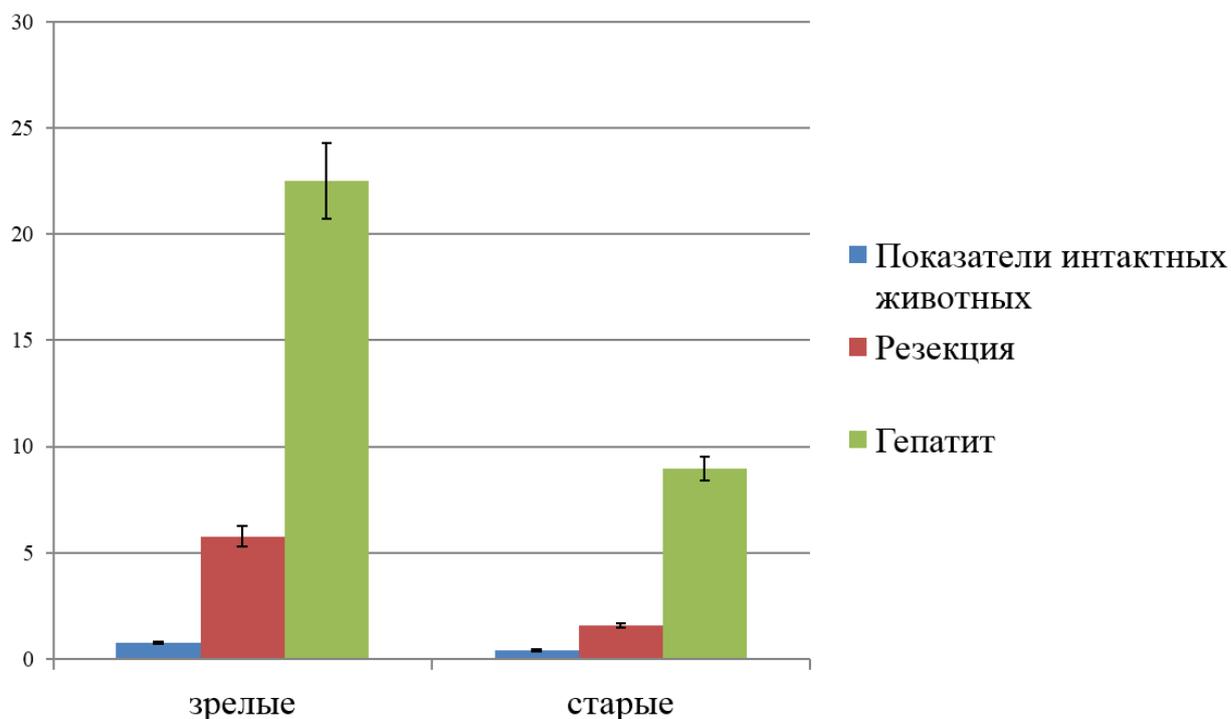
Таблица 3.5.4

Воздействие	Время после воздействия		
	1-е сутки	3-и сутки	7-е сутки
	Без введения ММСК		
Без операции	0,40±0,05	0,39±0,04	0,38±0,05
Резекция печени	0,42±0,03	2,81±0,27 ¹	1,5±0,10 ¹
CCl ₄	7,59±0,50 ^{1,3}	6,80±0,51 ^{1,3}	7,37±0,40 ^{1,3}
	С введение ММСК		
Без операции	0,39±0,05	0,40±0,04	0,39±0,04
Резекция печени	0,43±0,04	2,96±0,52 ¹	1,57±0,12 ¹
CCl ₄	7,26±0,58 ^{1,3}	6,96±0,45 ^{1,3}	8,96±0,55 ^{1,2,3}

¹ – отличие от интактных лабораторных животных той же возрастной группы, достоверно с $p < 0,05$; ² – отличие от лабораторных животных с тем же воздействием той же возрастной группы после введения ММСК, достоверно с $p < 0,05$; ³ – отличие от лабораторных животных при резекции печени той же возрастной группы, достоверно с $p < 0,05$.

Рисунок 3.17.

Митотический индекс зрелых и старых лабораторных животных на 7 сутки после введения ММСК на фоне экстремальных воздействий



Количество двухъядерных гепатоцитов на мм²

В обеих возрастных группах на первые и третьи сутки как без введения ММСК, так и после введения клеток количество двухъядерных гепатоцитов на фоне токсического гепатита значительно выше количества двухъядерных гепатоцитов на фоне субтотальной резекции печени. В то же время у старых

лабораторных животных на фоне экстремальных воздействий количество двухъядерных гепатоцитов возрастает больше чем у зрелых лабораторных животных в тех же условиях. На седьмые сутки у старых лабораторных животных сохраняется преобладание повышенного числа двухъядерных гепатоцитов на фоне токсического гепатита над повышенным количеством двухъядерных гепатоцитов при субтотальной резекции печени как без введения ММСК, так и с введением клеток (рисунок 3.18). При этом у зрелых лабораторных животных на фоне токсического гепатита и субтотальной резекции печени количество двухъядерных гепатоцитов достоверно не отличается (таблица 3.5.5, 3.5.6).

Количество двухъядерных гепатоцитов на мм² у зрелых мышей, М±m, n = 7

Таблица 3.5.5

Воздействие	Время после воздействия		
	1-е сутки	3-и сутки	7-е сутки
	Без введения ММСК		
Без операции	233,43±12,20	234,43±19,63	237,29±18,24
Резекция печени	334,31±12,30 ¹	380,97±10,15 ¹	320,77±10,64 ¹
CCl ₄	830,43±52,65 ^{1,3}	474,43±46,08 ^{1,3}	388,57±30,94 ¹
	С введение ММСК		
Без операции	234,14±16,98	235,86±10,12	235,86±20,16
Резекция печени	325,29±15,39 ¹	386,71±21,39 ¹	393,90±23,23 ^{1,2}
CCl ₄	807,43±56,65 ^{1,3}	647,43±51,39 ^{1,2,3}	471,71±31,96 ^{1,2}

¹ – отличие от интактных лабораторных животных той же возрастной группы, достоверно с $p < 0,05$; ² – отличие от лабораторных животных с тем же воздействием той же возрастной группы после введения ММСК, достоверно с $p < 0,05$; ³ – отличие от лабораторных животных при резекции печени той же возрастной группы, достоверно с $p < 0,05$.

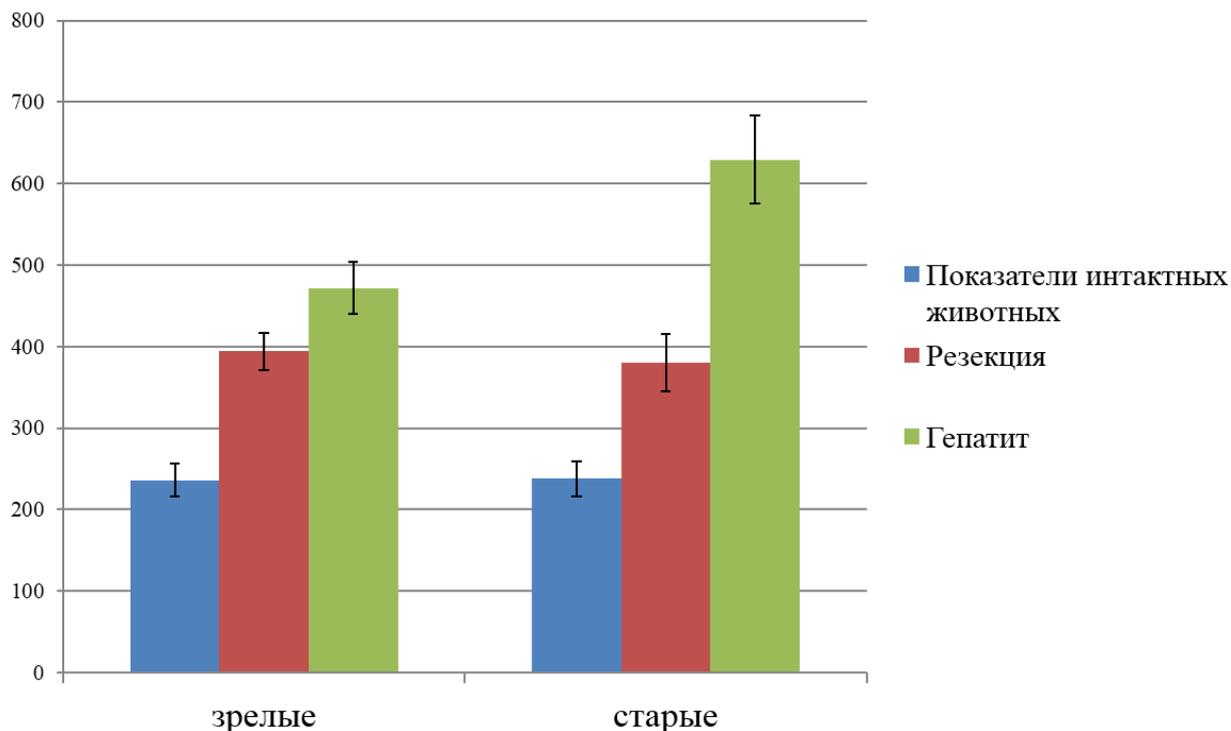
Количество двухъядерных гепатоцитов на мм² у старых мышей, М±m, n = 7

Таблица 3.5.6

Воздействие	Время после воздействия		
	1-е сутки	3-и сутки	7-е сутки
	Без введения ММСК		
Без операции	241,06±21,38	241,66±19,08	239,71±21,30
Резекция печени	310,74±28,49 ¹	343,43±25,8 ¹	305,74±22,52 ¹
CCl ₄	1035,86±92,41 ^{1,3}	736,14±56,37 ^{1,3}	471,43±30,49 ^{1,3}
	С введением ММСК		
Без операции	239,97±19,26	242,79±19,16	237,61±21,76
Резекция печени	333,60±31,83 ¹	353,86±36,16 ¹	379,71±35,33 ^{1,2}
CCl ₄	1018,00±99,14 ^{1,3}	937,00±70,29 ^{1,2,3}	629,14±53,80 ^{1,2,3}

¹ – отличие от интактных лабораторных животных той же возрастной группы, достоверно с $p < 0,05$; ² – отличие от лабораторных животных с тем же воздействием той же возрастной группы после введения ММСК, достоверно с $p < 0,05$; ³ – отличие от лабораторных животных при резекции печени той же возрастной группы, достоверно с $p < 0,05$.

Количество двухъядерных гепатоцитов зрелых и старых лабораторных животных на 7 сутки после введения ММСК на фоне экстремальных воздействий



Ядерно-цитоплазматический индекс

На первые сутки ядерно-цитоплазматический индекс как без введения ММСК, так и после введения клеток у зрелых лабораторных животных на фоне токсического гепатита значительно выше ядерно-цитоплазматического индекса на фоне субтотальной резекции печени. При этом у старых лабораторных животных на фоне токсического гепатита и субтотальной резекции печени ядерно-цитоплазматический индекс достоверно не отличается. На третьи и седьмые сутки в обеих возрастных группах сохраняется преобладание повышенного ядерно-цитоплазматического индекса на фоне токсического гепатита над повышенным митотическим индексом при субтотальной резекции печени как без введения ММСК, так и с введением клеток (рисунок 3.19). При этом ядерно-цитоплазматический индекс на фоне токсического гепатита превышает ядерно-

цитоплазматический индекс при субтотальной резекции в равной степени в обеих возрастных группах (таблица 3.5.7, 3.5.8).

Ядерно-цитоплазматический индекс
у старых мышей, $M \pm m$, $n = 7$

Таблица 3.5.7

Воздействие	Время после воздействия		
	1-е сутки	3-и сутки	7-е сутки
	Без введения ММСК		
Без операции	0,24±0,03	0,22±0,02	0,24±0,02
Резекция печени	0,32±0,01 ¹	0,27±0,01 ¹	0,29±0,02 ¹
CCl ₄	0,41±0,04 ^{1,3}	0,35±0,03 ^{1,3}	0,43±0,04 ^{1,3}
	С введение ММСК		
Без операции	0,24±0,02	0,23±0,01	0,23±0,02
Резекция печени	0,32±0,01 ¹	0,29±0,01 ¹	0,38±0,02 ^{1,2}
CCl ₄	0,41±0,04 ^{1,3}	0,50±0,03 ^{1,2,3}	0,56±0,05 ^{1,2,3}

¹ – отличие от интактных лабораторных животных той же возрастной группы, достоверно с $p < 0,05$; ² – отличие от лабораторных животных с тем же воздействием той же возрастной группы после введения ММСК, достоверно с $p < 0,05$; ³ – отличие от лабораторных животных при резекции печени той же возрастной группы, достоверно с $p < 0,05$.

Ядерно-цитоплазматический индекс
у старых мышей, $M \pm m$, $n = 7$

Таблица 3.5.8

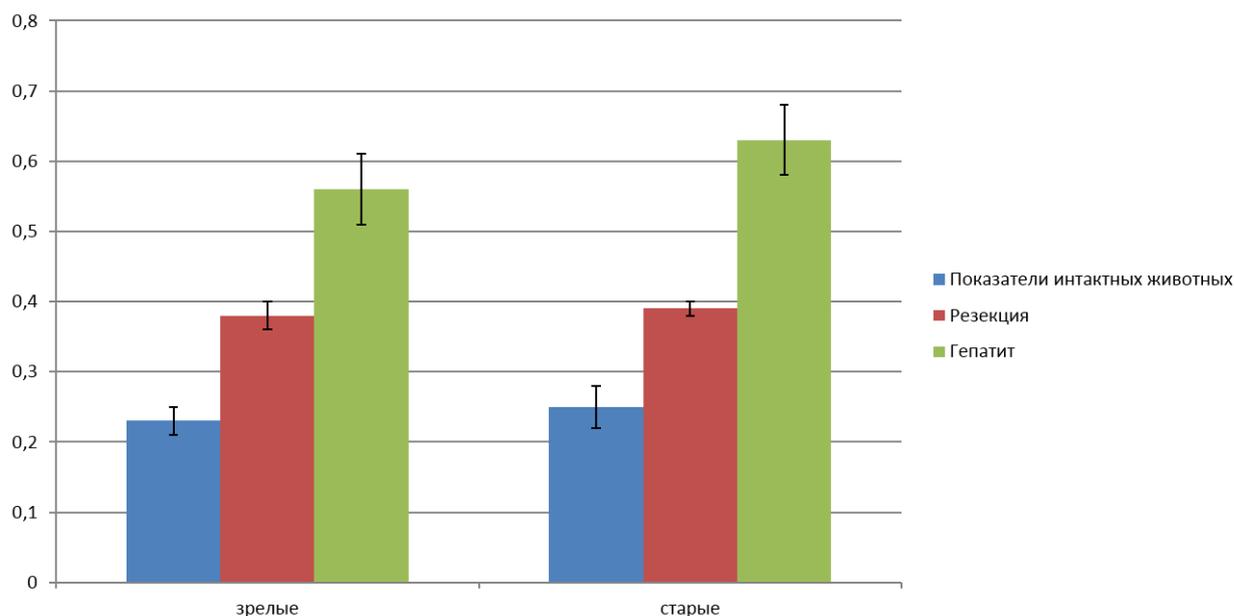
Воздействие	Время после воздействия		
	1-е сутки	3-и сутки	7-е сутки
	Без введения ММСК		
Без операции	0,25±0,02	0,23±0,02	0,25±0,02
Резекция печени	0,35±0,01 ¹	0,29±0,01 ¹	0,32±0,02 ¹

CCl ₄	0,41±0,03 ¹	0,45±0,03 ^{1,3}	0,52±0,02 ^{1,3}
	С введение ММСК		
Без операции	0,26±0,03	0,23±0,02	0,25±0,03
Резекция печени	0,35±0,01 ¹	0,29±0,01 ¹	0,39±0,01 ^{1,2}
CCl ₄	0,36±0,02 ¹	0,62±0,04 ^{1,2,3}	0,63±0,05 ^{1,2,3}

¹ – отличие от интактных лабораторных животных той же возрастной группы, достоверно с $p < 0,05$; ² – отличие от лабораторных животных с тем же воздействием той же возрастной группы после введения ММСК, достоверно с $p < 0,05$; ³ – отличие от лабораторных животных при резекции печени той же возрастной группы, достоверно с $p < 0,05$.

Рисунок 3.19.

**Ядерно-цитоплазматический индекс
зрелых и старых лабораторных животных на 7 сутки после
введения ММСК на фоне экстремальных воздействий**



Таким образом, на фоне токсического гепатита при трансплантации ММСК у зрелых лабораторных животных происходит восстановление содержания общего белка в периферической крови к седьмым суткам. В то время как у старых лабораторных животных на при трансплантации ММСК в любых экстремальных условиях и у зрелых лабораторных животных после введения ММСК на фоне субтотальной резекции печени содержания общего белка и в периферической

крови остается сниженной относительно интактных животных. В то же время активация клеточной и внутриклеточной регенерации у зрелых и старых лабораторных животных при введении ММСК при токсическом гепатите выражена сильнее, чем при субтотальной резекции печени. При этом у зрелых лабораторных животных при трансплантации ММСК на фоне действия экстремальных факторов преобладает активация клеточной регенерации, а у старых лабораторных животных преимущественно активация внутриклеточной регенерации.

Часть VI. Показатели микроядерного теста после трансплантации ММСК у зрелых и старых мышей в физиологических условиях, в условиях повреждения печени

Для оценки изучения мутагенных свойств трансплантированных ММСК на клетки печени зрелых и старых лабораторных животных в физиологических условиях, в условиях субтотальной резекции печени и после введения CCl_4 , проводился анализ частоты цитогенетически измененных гепатоцитов с помощью проведения микроядерного теста.

6.1. Показатели микроядерного теста после трансплантации ММСК у зрелых и старых мышей в физиологических условиях

При изучении показателей микроядерного теста в печени зрелых лабораторных животных в физиологических условиях на первые, третьи, седьмые сутки после трансплантации ММСК достоверных отличий от данных интактной группы не обнаружено (таблица 3.6.1).

Таблица 3.6.1

Содержание клеток с микроядрами у зрелых мышей после трансплантации

ММСК, $M \pm m$, $n = 7$

Сроки	Значение, ‰	
	NaCl	ММСК
1-е сутки	2,20±0,17	2,27±0,18
3-е сутки	2,17±0,17	2,21±0,18
7-е сутки	2,10±0,17	2,04±0,19

На первые, третьи, седьмые сутки при изучении показателей микроядерного теста в печени старых лабораторных животных в физиологических условиях после введения ММСК достоверных отличий от данных интактных животных не выявлено (таблица 3.6.2).

Таблица 3.6.2

Содержание клеток с микроядрами у старых мышей после трансплантации ММСК, $M \pm m$, $n = 7$

Сроки	Значение, ‰	
	NaCl	ММСК
1-е сутки	3,20±0,20	3,13±0,23
3-е сутки	3,21±0,22	3,27±0,23
7-е сутки	3,19±0,21	3,23±0,22

6.2. Показатели микроядерного теста после трансплантации ММСК у зрелых и старых мышей с субтотальной резекцией печени

На первые сутки при изучении содержания количества клеток с микроядрами в печени у зрелых лабораторных животных после субтотальной резекции печени не выявлено отличий от интактных лабораторных животных. На третьи сутки после субтотальной резекции печени отмечено увеличение клеток с микроядрами на 35,6% ($3,37 \pm 0,26\%$, $p < 0,05$) по сравнению с интактными животными. На седьмые сутки после субтотальной резекции печени отмечено сохранение повышенного числа клеток с микроядрами на 24,2% ($2,77 \pm 0,23\%$, $p < 0,05$) по сравнению с интактными животными. При субтотальной резекции печени после трансплантации ММСК у зрелых лабораторных животных на первые и третьи сутки не было обнаружено отличий от контрольной подгруппы.

На седьмые сутки у зрелых лабораторных животных на фоне субтотальной резекции печени после трансплантации ММСК впервые зарегистрировано снижение клеток с микроядрами на 25,3% ($2,21 \pm 0,16\%$, $p < 0,05$) по сравнению с данными контрольной подгруппы (таблица 3.6.3).

Таблица 3.6.3

Содержание клеток с микроядрами после трансплантации ММСК у зрелых мышей с субтотальной резекцией печени, $M \pm m$, $n = 7$

Сроки	Значение, ‰	
	NaCl	ММСК
1-е сутки	$2,23 \pm 0,21$	$2,17 \pm 0,17$
3-е сутки	$3,37 \pm 0,26^1$	$3,07 \pm 0,23^1$
7-е сутки	$2,77 \pm 0,23^1$	$2,21 \pm 0,16^2$

Примечание: ¹ – отличие от интактных зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$; ² – отличие от контрольной подгруппы зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

На первые сутки при изучении показателей микроядерного теста старых лабораторных животных после субтотальной резекции печени не выявлено отличий от интактных лабораторных животных. На третьи сутки у старых лабораторных животных после субтотальной резекции печени отмечено увеличение клеток с микроядрами на 37,1% ($5,11 \pm 0,44\%$, $p < 0,05$) по сравнению с интактными животными. На седьмые сутки после субтотальной резекции печени отмечено сохранение повышенного числа клеток с микроядрами на 30,7% ($4,60 \pm 0,37\%$, $p < 0,05$) по сравнению с интактными животными. Также как и у зрелых, у старых лабораторных животных при субтотальной резекции печени после трансплантации ММСК на первые и третьи сутки не было обнаружено отличий от контрольной подгруппы. На седьмые сутки у старых лабораторных животных на фоне субтотальной резекции печени после трансплантации ММСК впервые зарегистрировано снижение клеток с микроядрами на 23,3% ($3,73 \pm 0,26\%$, $p < 0,05$) по сравнению с данными контрольной подгруппы (таблица 3.6.4).

Содержание клеток с микроядрами после трансплантации ММСК у старых мышей с субтотальной резекцией печени, $M \pm m$, $n = 7$

Сроки	Значение, ‰	
	NaCl	ММСК
1-е сутки	3,23±0,23	3,16±0,24
3-е сутки	5,11±0,44 ¹	4,83±0,38 ¹
7-е сутки	4,60±0,37 ¹	3,73±0,26 ^{1,2}

Примечание: ¹ – отличие от интактных старых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$; ² – отличие от контрольной подгруппы старых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

6.3. Показатели микроядерного теста после трансплантации ММСК у зрелых и старых мышей с токсическим гепатитом

При изучении содержания клеток с микроядрами в печени у зрелых лабораторных животных на первые сутки после введения CCl_4 не выявлено отличий от интактных лабораторных животных. На третьи сутки после введения CCl_4 отмечено увеличение клеток с микроядрами на 59,7% ($5,39 \pm 0,41\%$, $p < 0,05$) по сравнению с интактными животными. На седьмые сутки после введения CCl_4 отмечено сохранение повышенного числа клеток с микроядрами на 61,5% ($5,46 \pm 0,43\%$, $p < 0,05$) по сравнению с интактными животными. В условиях введения CCl_4 после трансплантации ММСК у зрелых лабораторных животных на первые сутки не было обнаружено отличий от контрольной подгруппы. На третьи сутки на фоне введения CCl_4 после трансплантации ММСК зарегистрировано снижение клеток с микроядрами на 39,2% ($3,87 \pm 0,26\%$, $p < 0,05$) по сравнению с данными контрольной подгруппы. На седьмые сутки у зрелых лабораторных на фоне введения CCl_4 после трансплантации ММСК отмечено снижение клеток с

микроядрами на 44,1% ($3,79 \pm 0,27\%$, $p < 0,05$) по сравнению с данными контрольной подгруппы (таблица 3.6.5).

Таблица 3.6.5

Содержание клеток с микроядрами после трансплантации ММСК у зрелых мышей с токсическим гепатитом, $M \pm m$, $n = 7$

Сроки	Значение, %	
	NaCl	ММСК
1-е сутки	$2,26 \pm 0,21$	$2,21 \pm 0,19$
3-е сутки	$5,39 \pm 0,41^{1,3}$	$3,87 \pm 0,26^{1,2,3}$
7-е сутки	$5,46 \pm 0,43^{1,3}$	$3,79 \pm 0,27^{1,2,3}$

Примечание: ¹ – отличие от интактных зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$; ² – отличие от контрольной подгруппы зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$; ³ – отличие от лабораторных животных при резекции печени той же возрастной группы, достоверно с $p < 0,05$.

При изучении показателей микроядерного теста старых лабораторных животных на первые сутки после введения CCl_4 не зарегистрировано отличий от интактных лабораторных животных. На третьи сутки после введения CCl_4 отмечено увеличение клеток с микроядрами на 61,9% ($8,43 \pm 0,62\%$, $p < 0,05$) по сравнению с интактными животными. На седьмые сутки после введения CCl_4 отмечено сохранение повышенного числа клеток с микроядрами на 62,8% ($8,57 \pm 0,74\%$, $p < 0,05$) по сравнению с интактными животными. В условиях введения CCl_4 после трансплантации ММСК у старых лабораторных животных на первые и третьи сутки не было обнаружено отличий от контрольной подгруппы. На третьи сутки у старых лабораторных животных на фоне введения CCl_4 после трансплантации ММСК отмечено снижение клеток с микроядрами на 46,1% ($5,77 \pm 0,43\%$, $p < 0,05$), на седьмые – уменьшение клеток с микроядрами на 34,6% ($5,60 \pm 0,49\%$, $p < 0,05$), по сравнению с данными контрольной подгруппы (таблица 3.6.6).

Таблица 3.6.6

Содержание клеток с микроядрами после трансплантации ММСК у старых мышей с токсическим гепатитом, $M \pm m$, $n = 7$

Сроки	Значение, ‰	
	NaCl	ММСК
1-е сутки	3,27±0,26	3,21±0,24
3-е сутки	8,43±0,62 ^{1,3}	5,77±0,43 ^{1,2,3}
7-е сутки	8,57±0,74 ^{1,3}	5,60±0,49 ^{1,2,3}

Примечание: ¹ – отличие от интактных старых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$; ² – отличие от контрольной подгруппы старых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$; ³ – отличие от лабораторных животных при резекции печени той же возрастной группы, достоверно с $p < 0,05$.

Таким образом, трансплантация ММСК зрелым и старым лабораторным животным в физиологических условиях не привела к изменению количества клеток с микроядрами в печени. На фоне субтотальной резекции печени после трансплантации ММСК у зрелых и старых лабораторных животных, выявлено снижение количества клеток с микроядрами на седьмые сутки. Трансплантация ММСК зрелым лабораторным животным при введении CCl_4 привела к снижению повышенного числа клеток с микроядрами уже на третьи сутки. В то время как у старых лабораторных животных трансплантация ММСК при введении CCl_4 способствовала снижению повышенного количества клеток с микроядрами к седьмым суткам. На третьи и седьмые сутки у зрелых и старых мышей как без введения ММСК, так и при трансплантации клеток количество клеток с микроядрами на фоне токсического гепатита значительно выше, чем число клеток с микроядрами на фоне субтотальной резекции.

ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования позволили определить особенности влияния плацентарных ММСК на регенерацию печени в физиологических условиях и в условиях её повреждения у зрелых и старых мышей. В настоящем исследовании повреждение печени производилось путем моделирования токсического поражения печени введением четыреххлористого углерода, а также проведением субтотальной резекции печени. С целью оценки эффективности трансплантации ММСК были изучены уровни следующих биохимических показателей периферической крови: общий белок, альбумин, мочевины, глюкоза, общий билирубин, активность аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, щелочной фосфатазы. Анализ морфологических изменений в печени производился путем определения морфометрических показателей: массы печени, количество гепатоцитов на единицу площади, площадь гепатоцитов, площадь ядра гепатоцитов, площадь цитоплазмы гепатоцитов, ядерно-цитоплазматический индекс, количество двухъядерных гепатоцитов. Также производилось определение митотического, апоптотического индексов, учет количества гепатоцитов с микроядрами.

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

В условиях субтотальной резекции печени введение плацентарных ММСК привело к восстановлению биохимических и морфометрических показателей печени. В периферической крови выявлено восстановление активности ферментов - маркеров цитолиза гепатоцитов (АЛТ, АСТ), щелочной фосфатазы, восстановление содержания фибриногена. Эти изменения обнаружены как у зрелых, так и у старых лабораторных животных. В то же время выявлены отличительные особенности в механизмах регенерации изучаемых возрастных групп. У зрелых мышей регенерация печени достигается за счет как клеточных, так и внутриклеточных механизмов регенерации. В то время как в старом организме на фоне введения ММСК регенерация реализуется за счет

внутриклеточных механизмов. На фоне субтотальной резекции печени после трансплантации ММСК у зрелых и старых мышей выявлено снижение уровня запрограммированной клеточной гибели и повышенного количества клеток с микроядрами.

В условиях токсического гепатита после введения ММСК установлено, что в обеих изучаемых возрастных группах при анализе биохимических показателей периферической крови выявлено уменьшение повышенного уровня трансаминаз (активность АЛТ, АСТ). У зрелых лабораторных животных отмечено также восстановление активности щелочной фосфатазы и повышение содержания общего белка, альбуминов и фибриногена до значений интактных лабораторных животных. У старых лабораторных животных произошло восстановление уровня фибриногена. Было показано, что активация регенерации печени в зрелом организме на фоне её повреждения после трансплантации плацентарных ММСК обеспечивается за счет клеточных и внутриклеточных механизмов. В то время как старый организм отвечает активацией преимущественно внутриклеточных механизмов. Трансплантация ММСК зрелым и старым лабораторным животным при введении четыреххлористого углерода привела к ингибированию апоптоза и снижению повышенного числа клеток с микроядрами.

При изучении особенностей влияния плацентарных ММСК на регенерацию печени в физиологических условиях обнаружено, что биохимические показатели периферической крови, отражающие участие печени в регуляции белкового, углеводного, пигментного обменов у зрелых и старых лабораторных животных, а также показатели цитолиза гепатоцитов (АСТ, АЛТ), щелочная фосфатаза не отличались от данных лабораторных животных, которым не проводилась трансплантация клеток. Анализ изучаемых морфологических показателей печени в физиологических условиях свидетельствовал об отсутствии эффекта на трансплантацию ММСК в обеих возрастных группах. Трансплантация ММСК зрелым и старым лабораторным животным в физиологических условиях не привела к изменению количества клеток с микроядрами в печени.

На первые сутки после субтотальной резекции печени у зрелых и старых лабораторных животных отмечалось изменение биохимических показателей периферической крови. Было зарегистрировано уменьшение уровня мочевины, содержания глюкозы, повышение общего билирубина. В то же время отмечено уменьшение уровня общего белка и альбуминов, как показателей белкового обмена в печени в обеих возрастных группах. Также было выявлено возрастание активности АСТ, АЛТ, щелочной фосфатазы, что свидетельствует о наличии цитолиза гепатоцитов. При анализе данных морфометрического исследования печени на первые сутки у зрелых и старых лабораторных животных на фоне субтотальной резекции печени было выявлено снижение массы печени, повышение апоптотического индекса, но не было достоверных данных об изменении активности клеточной регенерации. При описании состояния внутриклеточной регенерации в обеих возрастных группах было установлено увеличение количества двухъядерных гепатоцитов, а также ядерно-цитоплазматического индекса. В настоящем исследовании после субтотальной резекции установлено увеличение площади цитоплазмы гепатоцитов (в группе зрелых лабораторных животных), увеличением площади ядра гепатоцитов в обеих возрастных группах относительно показателей интактных лабораторных животных. Эти изменения привели к увеличению ЯЦИ у зрелых и старых лабораторных животных. Субтотальная резекция печени на первые сутки у зрелых и старых лабораторных животных не сопровождалась изменением количества клеток с микроядрами в печени.

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

На третьи сутки, также как и на первые, после субтотальной резекции печени в обеих возрастных группах лабораторных животных было выявлено

изменение изучаемых в данном исследовании биохимических показателей периферической крови. Отмечено уменьшение уровня мочевины и содержания глюкозы, повышение общего билирубина. Содержание общего белка, альбуминов и фибриногена было ниже, чем у интактных животных в обеих возрастных группах. Сохранялись повышенные показатели АСТ и АЛТ, а также было зарегистрировано увеличение активности щелочной фосфатазы. При этом в обеих возрастных группах после субтотальной резекции печени было отмечено достоверное снижение массы печени, повышенный показатель апоптотического индекса, а также снижение количества гепатоцитов, на фоне возрастания митотического индекса. Морфометрические показатели внутриклеточной регенерации, такие как повышение двухъядерных гепатоцитов, площадь гепатоцитов, ядерно-цитоплазматический индекс, обусловленный увеличением площади ядра гепатоцитов (у старых лабораторных животных), также были повышены. Субтотальная резекция печени на третьи сутки у зрелых и старых лабораторных животных привела к увеличению числа клеток с микроядрами в печени.

В то же время у зрелых лабораторных животных 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 механизмов, с помощью которых ММСК способствуют активации регенерации печени, является их способность продуцировать противовоспалительные факторы, такие как интерлейкин-10 (IL 10), (TGF- β), простагландин E₂ (PGE₂) [166, 165, 82]. Выделение простагландина E₂ способствует снижению способности моноцитов дифференцироваться в дендритные клетки и продуцировать синтез провоспалительных цитокинов. Простагландин E₂ вместе с трансформирующим фактором роста β уменьшают пролиферацию, цитотоксическую активность и выделение γ -IFN Т-лимфоцитами и NK-клетками [133]. Интерлейкин-10 влияет на дендритные клетки, ингибируя

синтез TNF- α и их способность активировать лейкоциты [122]. 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 субтотальной резекции печени. Трансплантация ММСК в это время у зрелых и старых лабораторных животных, также как и на первые сутки, не привела к возникновению различий изучаемых морфометрических показателей между показателями контрольной и опытной подгрупп. Введение ММСК при субтотальной резекции печени на третьи сутки у зрелых и старых лабораторных животных не привело к изменению апоптотического и митотического индексов и количества клеток с микроядрами в печени.

На седьмые сутки после субтотальной резекции печени у зрелых и старых лабораторных животных сохраняется пониженный уровень мочевины и глюкозы, повышенное количество общего билирубина. Содержание общего белка, альбуминов и фибриногена было снижено по сравнению с интактными животными в обеих возрастных группах. Было выявлено повышение показателей АСТ и АЛТ, а также увеличение активности щелочной фосфатазы.

При этом в обеих возрастных группах после субтотальной резекции печени регистрировалось увеличение апоптотического индекса, возрастание митотического индекса. Морфометрические показатели внутриклеточной регенерации, таких как количество двухъядерных гепатоцитов, площадь гепатоцитов (у старых лабораторных животных), ядерно-цитоплазматический индекс, площадь ядра гепатоцитов, также были повышены.

В то же время у зрелых лабораторных животных в ответ на трансплантацию ММСК произошло восстановление содержания фибриногена, активности АСТ, АЛТ, щелочной фосфатазы до значений интактных животных.

При этом у старых лабораторных животных показатели фибриногена, активности АСТ, АЛТ, щелочной фосфатазы также существенно снизились относительно контрольной подгруппы, но не достигли значений интактных

животных. У зрелых лабораторных животных отмечено достоверное повышение содержания сниженного уровня мочевины. Остальные изучаемые показатели белкового, углеводного, пигментного обменов в обеих возрастных группах на фоне введения ММСК не достигли значений интактных животных. Восстановление показателей фибриногена у зрелых и у старых лабораторных животных можно объяснить увеличением числа функционирующих гепатоцитов на фоне дифференцировки ММСК в гепатоциты и под влиянием факторов роста, синтезируемых трансплантируемыми ММСК [65]. Особый интерес представляют данные о важной роли факторов роста ММСК – фактор роста гепатоцитов (HGF), эпидермальный фактор роста (EGF), фактор стволовой клетки (SCF) в репаративной регенерации печени [148, 144, 123]. Анализ данных морфометрического исследования печени зрелых лабораторных животных на фоне субтотальной резекции печени 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 то время как у старых лабораторных животных отмечались только повышения 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 обусловлена продуцируемыми ими факторами роста: фактор роста гепатоцитов (HGF), [26, 180, 160] эпидермальный фактор роста (EGF), фактор стволовой клетки (SCF) не выражена у старых лабораторных животных по ряду причин. Известно, что при старении происходит снижение продукции собственных факторов роста, влияющих на регенерацию гепатоцитов. Снижение чувствительности гепатоцитов к этим факторам роста приводит к отсутствию эффекта от трансплантации ММСК на клеточную регенерацию. Снижение пролиферативной способности гепатоцитов при старении также реализуется 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 [182, 16]. Однако 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 субтотальной резекции печени после трансплантации ММСК к седьмым суткам впервые было определено повышение массы печени по сравнению с контрольной подгруппой (рисунок 1).

Масса печени после трансплантации ММСК на 7-е сутки у зрелых и старых мышей с субтотальной резекцией печени

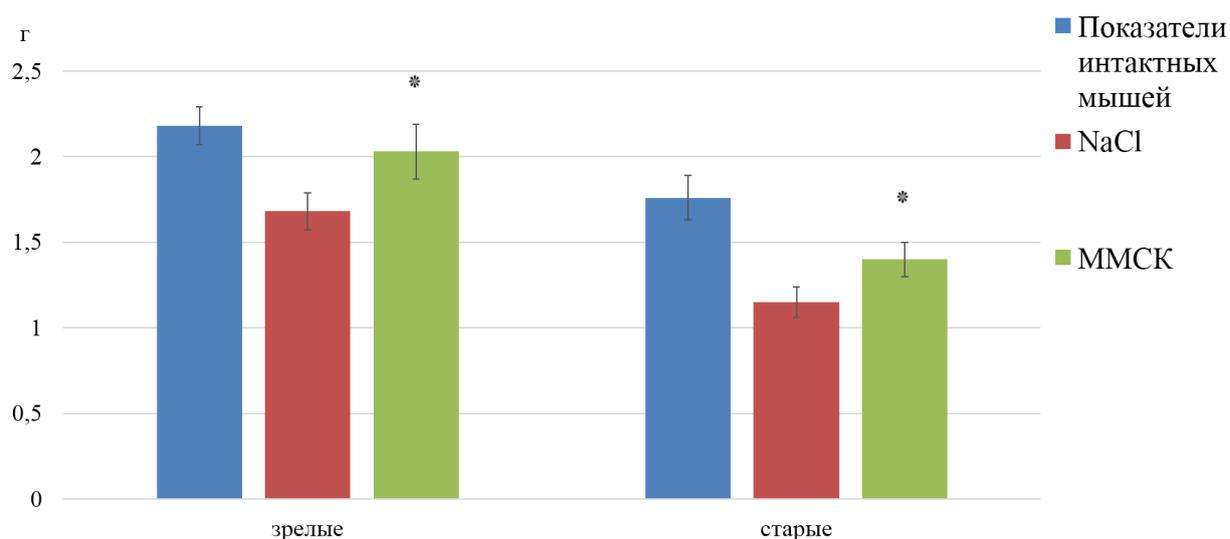


Рисунок 1.

Также было отмечено снижение апоптотического индекса и уменьшение числа клеток с микроядрами по сравнению с контролем (рисунок 2).

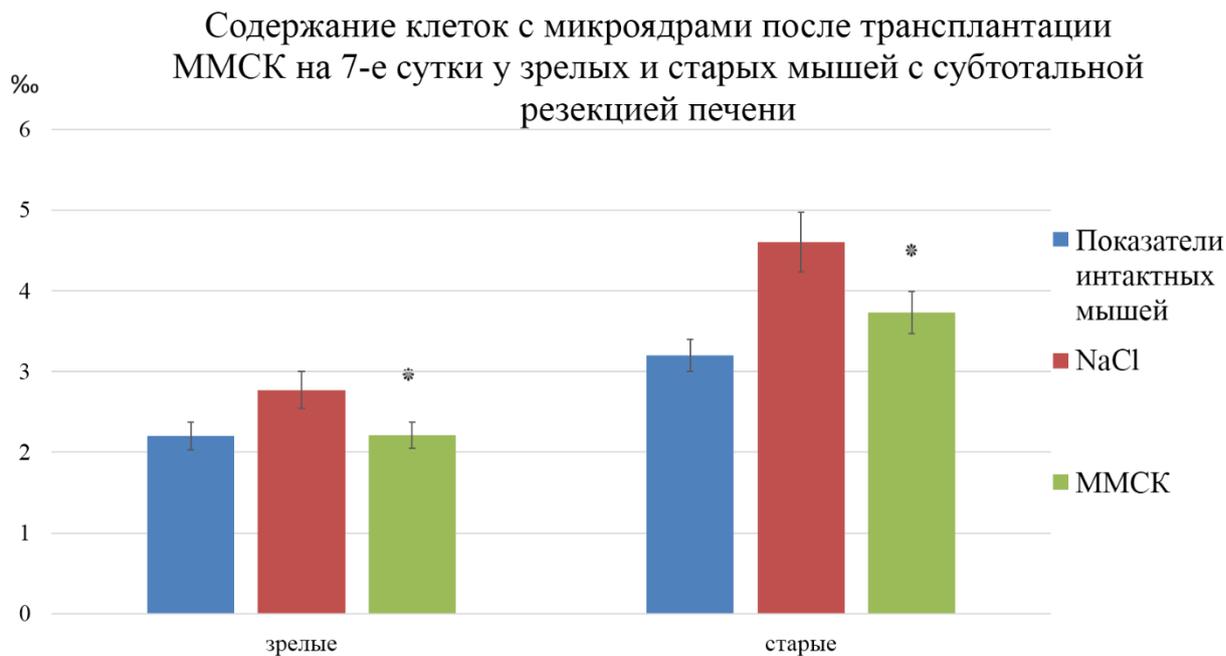


Рисунок 2.

Эти изменения могут быть вызваны способностью ММСК посредством межклеточных контактов вызывать экспрессию генов, кодирующих синтез белков теплового шока с молекулярной массой 70 кДа [116]. Белки теплового шока (70 кДа) являются шаперонами, обеспечивающими стабильность структурных и функциональных белков клетки. Белки теплового шока в клетке, подвергнутой стрессу, интенсивно связываются с денатурирующими белками и препятствуют их разрушению. Также известно, что белки теплового шока участвуют в защите клеток от стрессиндуцируемого апоптоза, блокируя пути его активации и стабилизируя клеточные структуры [40, 12, 193].

На первые сутки после введения четыреххлористого углерода у лабораторных животных обеих возрастных групп было отмечено изменение биохимических показателей периферической крови: увеличение уровня общего билирубина, уменьшение содержания глюкозы. Также было выявлено значительное возрастание активности АСТ, АЛТ и щелочной фосфатазы, что свидетельствует о наличии цитолиза гепатоцитов.

В то же время на фоне введения четыреххлористого углерода после трансплантации ММСК, у зрелых и старых лабораторных животных не было выявлено различий в биохимических показателях периферической крови между контрольной и опытной подгруппами.

При анализе морфометрических показателей на первые сутки у зрелых лабораторных животных на фоне введения четыреххлористого углерода наблюдается значительное увеличение митотического индекса, количества гепатоцитов, в то время как у старых лабораторных животных при повышенном митотическом индексе содержание гепатоцитов достоверно не отличалось от данных в интактной группе. При описании состояния внутриклеточной регенерации в обеих возрастных группах было установлено увеличение количества двухъядерных гепатоцитов, а также ядерно-цитоплазматического индекса. Изменение ЯЦИ обусловлено уменьшением площади цитоплазмы гепатоцитов, при этом площадь ядра гепатоцитов существенно не отличалась по сравнению с данным показателем у интактных лабораторных животных. В обеих возрастных группах отмечено значительное увеличение апоптотического индекса в сравнении с интактными лабораторными животными. Уменьшение площади гепатоцитов и площади цитоплазмы гепатоцитов, вероятно, обусловлено снижением содержания гликогена в гепатоцитах на ранних сроках после воздействия четыреххлористым углеродом [24, 58]. Введение четыреххлористого углерода на первые сутки у зрелых и старых лабораторных животных не привело к изменению количества клеток с микроядрами в печени.

При трансплантации ММСК у зрелых и старых лабораторных животных 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 были выявлены изменения биохимических показателей периферической крови. При этом, изучаемые биохимические показатели белкового, углеводного, пигментного обменов, активность АСТ, АЛТ, щелочной фосфатазы существенно отличались от данных интактных животных в обеих возрастных группах. В то же время при морфометрическом исследовании у старых лабораторных животных на фоне введения четыреххлористого углерода в отличие от зрелых лабораторных животных было отмечено увеличение площади ядра гепатоцитов. При этом в обеих возрастных группах показатели клеточной регенерации (митотический индекс), внутриклеточной регенерации (площадь гепатоцитов, площадь цитоплазмы гепатоцитов, количество двухъядерных гепатоцитов, ядерно-цитоплазматический индекс), апоптотический индекс и количество клеток с микроядрами так же, как и на 1-е сутки достоверно отличались от интактных лабораторных животных.

Вместе с тем, доказано, что трансплантация ММСК на третьи сутки после введения четыреххлористого углерода обеим возрастным группам лабораторных животных привела к существенному снижению активности АЛТ и АСТ в периферической крови по сравнению с лабораторными животными без введения ММСК.

Это обусловлено резким снижением числа разрушенных гепатоцитов. 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 γ . 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. 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 животных 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

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.

На седьмые сутки после введения четыреххлористого углерода у зрелых лабораторных животных показатели глюкозы восстановились до значений интактных животных, в то время как у старых лабораторных животных содержание глюкозы оставалось ниже значений интактных лабораторных животных. Содержание общего белка, альбуминов и фибриногена было ниже, а показатели общего билирубина, активности щелочной фосфатазы, АСТ и АЛТ в обеих возрастных группах были достоверно выше значений интактных животных. При анализе морфометрических показателей на седьмые сутки у зрелых и старых лабораторных животных выявлено сохранение изменений, соответствующих изменениям данной возрастной группы на третьи сутки исследования. При этом у зрелых животных впервые было установлено увеличение площади ядра гепатоцитов в отличие от интактных животных. На седьмые сутки после введения

четырёххлористого углерода в обеих возрастных группах регистрировалось повышенное количество клеток с микроядрами.

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

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

Полученные данные морфометрического исследования свидетельствуют, что на седьмые сутки у зрелых и старых лабораторных животных можно отметить снижение апоптотического индекса, уменьшение числа гепатоцитов с микроядрами (рисунок 3) и увеличение активности клеточной и внутриклеточной регенерации на фоне трансплантации ММСК.

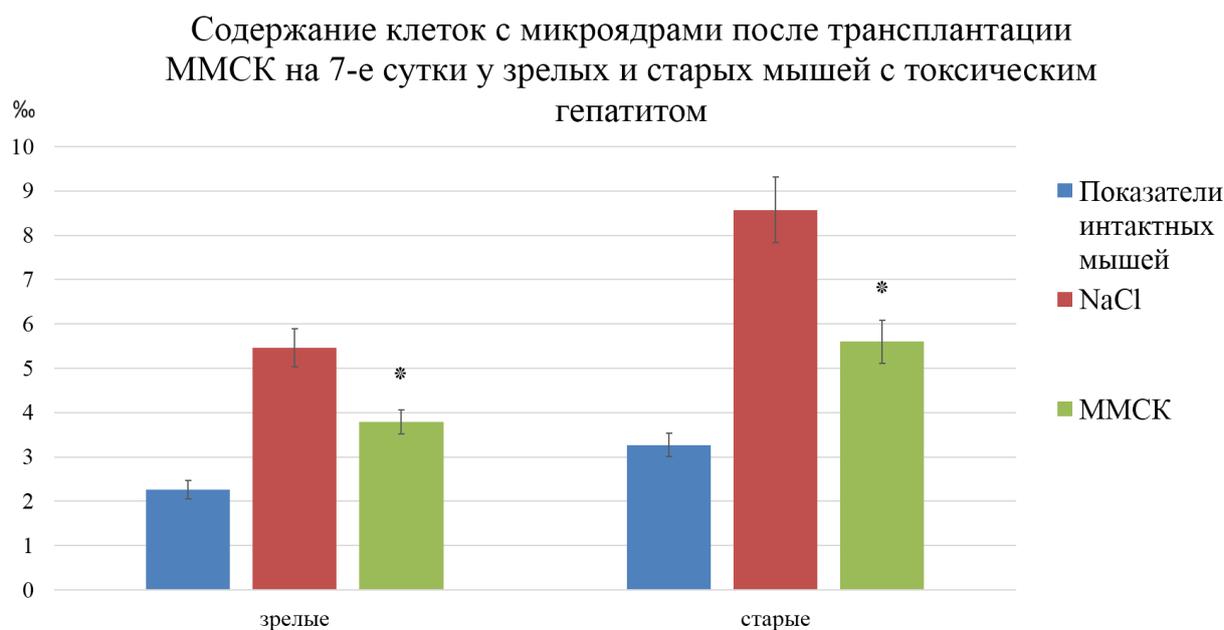


Рисунок 3.

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

Выявленные эффекты могут быть обусловлены биологическими особенностями ММСК: способность к дифференцировке, синтез факторов роста, продукция противовоспалительных факторов, способность 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 животных регенерация печени на фоне введения ММСК реализуется через клеточные и внутриклеточные механизмы регенерации. В то время как у старых лабораторных животных восстановление данного органа происходит преимущественно за счет внутриклеточных механизмов (схема 1).

ВЫВОДЫ

1. Активация процессов регенерации печени после её повреждения при трансплантации ММСК зависит от возраста и от характера воздействия.
2. Трансплантация ММСК при субтотальной 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 СОКРАЩЕНИЙ

АИ – апоптотический индекс

АЛТ – аланинаминотрансфераза

АСТ – аспартатаминотрансфераза

ДК – дендритная клетка

ИЛ – интерлейкин

МИ – митотического индекс

ММСК – мультипотентная мезенхимальная стромальная клетка

ОПН – острая печеночная недостаточность

ПГ – простагландин

AR – амфирегулин

CXCR4 – хемокиновый рецептор - 4 тип.

EGF – эпидермальный фактор роста

FBS – фетальная бычья сыворотка

HGF – фактор роста гепатоцитов

HSP – белок теплового шока

IFN – γ – гамма интерферон

IL-6 – интерлейкина-6

LPS – липополисахарид

NF- κ B – ядерного фактора-каппа Б

NK – натуральный киллер, клетка

PGE2 – простагландин E2

SCA-1 – антиген стволовой клетки-1

SCF – фактор стволовых клеток

SDF-1 – стромой вырабатываемый фактор-1

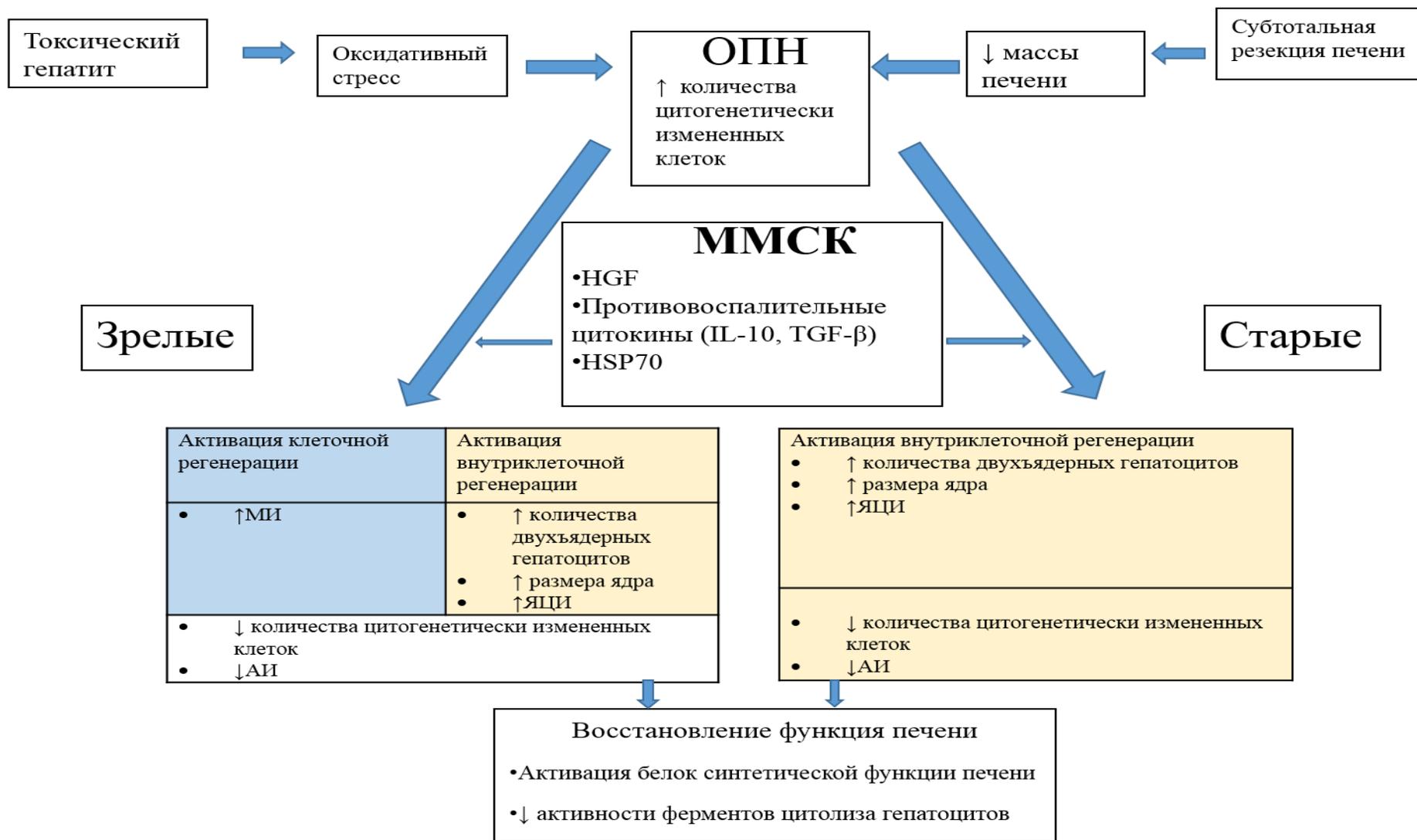
STAT3 – сигнальный белок и активатор транскрипции 3

TGF- β – трансформирующий фактор роста- β

TNF – фактора некроза опухоли

NFR1 – рецептор к фактору некроза опухоли типа 1

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



СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабаева А.Г. Регенерация : факты и перспективы / А.Г. Бабаева. – Москва, РАМН АНО, - 2009. – 334 с.
2. Базарный В.В. Характеристика гематологических параметров у реципиентов печени / В.В. Базарный, А.Ю. Максимова, Е.Н. Бессонова // Вестник гематологии. – 2019. - №3(15). – С. 5.
3. Бозо И.Я. Особенности мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, полученных из различных интраоральных источников / И.Я. Бозо, В.Л. Зорин, И.И. Еремин // Гены & Клетки. – 2014. - № 9(4). – С. 34-42.
4. Бурганова Г.Р. Роль макрофагов в патоморфогенезе алкогольной болезни печени / Г.Р. Бурганова, Р.В. Деев, А.П. Киясов // Гены & Клетки. – 2017. - № 7(1). – С. 38-40.
5. Быков В.Л. Цитология и общая гистология. Функциональная морфология клеток и тканей человека: учебник для студентов медицинских институтов / В.Л. Быков. - Санкт-Петербург : Сотис, 2016. - 520 с.
6. Власов А.П. Возможности индуцирования репарации тканей при механической желтухе неопухолевого происхождения / А.П. Власов, П.П. Зайцев, В.А. Болотских, Т.И. Власова, В.И. Давыдкин, Н.С. Шейранов, Н.А. Окунев // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 2018. - № 12. - С. 57-64.
7. Власов А.П. Значение защиты печени в процессе устранения эндотоксикоза / А.П. Власов, О.В. Маркин, Н.С. Шейранов, Т.И. Власова, В.А. Болотских, Н.А. Мышкина, К.М. Синявина, П.О. Болушев // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2019. – Т. 82. № 11. - С. 27-31.
8. Власов А.П. Метаболические перестройки в печени при эндогенной интоксикации / А.П. Власов, О.В. Камкина, В.А. Трофимов, Т.И. Власова, С.В. Абрамова, В.А. Болотских // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2017. – Т. 163. № 3. - С. 294-297.

9. Возможность получения трехмерной конструкции хряща из мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток / О.Г.Макеев, П.С. Зубанов, А.И. Улыбин [и др.] // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2008. - № 4(22). – С. 71-73.
10. Горецкая М.В. Роль нейтрофилов, лимфоцитов, клеток Ито, Купферовских, дендритных, синусоидальных эндотелиальных клеток в печени / М.В. Горецкая // Журнал ГрГМУ. – 2008. - №1. – С. 28-34.
11. 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. - № 1 (15). – С. 55-59.
12. Жданов Д.Д. Белки теплового шока в качестве механизма клеточной защиты / Д.Д. Жданов, В.С. Орлова // Вестник РУДН. Сер. Экология и безопасность жизнедеятельности. – 2007. - № 2. – С. 31-34.
13. Ивашкин, В.Т. Болезни печени и желчевыводящих путей: руководство для врачей / В.Т. Ивашкина. – Москва : Вести, 2002. – 416 с.
14. К вопросу о лабораторной диагностике аутоиммунных болезней печени / В.В. Базарный, Е.А. Партылова, Е.Ю. Михайлова [и др.] // Медицинская иммунология. – 2015. - №17. – С. 120.
15. Казакова И.А. Механизмы влияния макрофагов на репаративную регенерацию : диссертация ... кандидата биологических наук : 03.03.01 / Казакова Ирина Александровна. – Екатеринбург, 2014.- 41 с.
16. Калинин А.Л. Морфологические и патофизиологические особенности печени у пожилых пациентов / А. Л. Калинин // Проблемы здоровья и экологии. – 2015. - С. 13-17.
17. Колмакова Т.С. Использование микроядерного теста для оценки эффективности лечения аллергии у детей : метод. рекомендации / Т.С. Колмакова, С.Н. Белик, Е.В. Моргуль [и др.]; РостГМУ – Ростов н/Д, 2013. - 31 с.
18. Лазаренко Л.В. Изучение экспрессии рецепторов фактора некроза опухоли и интерлейкина в тканях печени у животных, длительно получавших нимесулид /

- Л.В. Лазаренко, П.В. Косарева, Е.И. Самоделкин, В.П. Хоринко // Пермский медицинский журнал. – 2017. – Т. 34. № 3.- С. 65-71.
19. Лазаренко Л.В. Фактор некроза опухоли в патогенезе НПВП-ассоциированной гепатопатии / Л.В. Лазаренко, П.В. Косарева, Е.И. Самоделкин, В.П. Хоринко // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2017. – Т. 6. № 3.- С. 50-55.
20. Лазаренко Л.В. Экспериментальная НПВП-индуцированная гепатопатия при длительном приеме нимесулида / Л.В. Лазаренко, П.В. Косарева, Е.И. Самоделкин, В.П. Хоринко // Пермский медицинский журнал. – 2015. – Т. 32. № 3.- С. 120-123.
21. Лазебник Л.Б. Возрастные изменения печени (клинические и морфологические аспекты) / Л.Б. Лазебник, Л.Ю. Ильченко // Клиническая геронтология. – 2007. - №1. – С. 3-8.
22. Лазебник Л.Б. Невирусные поражения печени у пожилых / Л.Б. Лазебник, И.Г. Журавлева // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2003. - №1. - С. 40-46.
23. Лазебник Л.Б. Современное представление о фиброзе печени и подходах к его лечению у больных неалкогольным стеатогепатитом / Л.Б.Лазебник, В.Г. Радченко, П.В. Селиверстов // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2017. - №12 (148). – С. 98-109.
24. Лебедева Е.И. Качественные и количественные показатели содержания гликогена в печени крыс в динамике развития токсического цирроза / Е.И. Лебедева, О.Д. Мяделец // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2015. - № 1. – С. 31-35.
25. Лекоев Г.З. Цикл лекций по частной и общей патологической анатомии / Г.З. Лекоев. – Владикавказ : Северо-Осетинская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию, 2010. - 528 с.
26. Лепехова С.А. Роль фактора роста гепатоцитов в регенерации печени / С.А. Лепехова, К.А. Апарцин, А.И. Искра // Фундаментальные исследования. - 2014. - №7 (1). - С. 187-192.

27. Лукашик С.П. Острая печеночная недостаточность у взрослых / С.П. Лукашик, И.А. Карпов / Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия/. – 2019. - №21(1). – С. 46-55.
28. Лукашик С.П. Острая печеночная недостаточность у взрослых: этиология, клинические проявления, методы коррекции / С.П. Лукашик, И.А. Карпов // Архив внутренней медицины. – 2017. - №3. – С. 171-180.
29. Лупатов А.Ю. Сравнение профиля экспрессии поверхностных молекулярных маркеров на мезенхимальных стромальных клетках культур, полученных из эндометрия и пуповины человека / А.Ю. Лупатов, Р.Ю. Сарыглар, В.Д. Чупрынин // Биомедицинская химия – 2017. - № 63(1). – С. 85-90.
30. Лызикив А. Н. Механизмы регенерации печени в норме и при патологии / А. Н. Лызикив, А. Г. Скуратов, Б. Б. Осипов // Проблемы здоровья и экологии. - 2015. - С. 4-9.
31. Лызикив А. Н. Стволовые клетки в регенеративной медицине: достижения и перспективы / А. Н. Лызикив, Б. Б. Осипов, А. Г. Скуратов // Проблемы здоровья и экологии. - 2015. - С. 4-8.
32. 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.
33. 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. - № 1(163). – С. 73 – 77.
34. 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.

35. Маклакова И.Ю. Изменение морфометрических и цитологических показателей селезенки при острой кровопотере на фоне введения стволовых клеток / И.Ю. Маклакова, А.П. Ястребов, Д.Ю. Гребнев // Успехи Геронтологии. – 2015. - № 2(28). – С. 218–221.
36. 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. - № 3(29). – С. 433-436.
37. Маклакова И.Ю. Экспериментальные исследования влияния сочетанной трансплантации ММСК и ГСК на регенерацию эпителия кишечника в условиях воздействия экстремальных факторов / И.Ю. Маклакова, Д.Ю. Гребнев, С.Л. Леонтьев // Гены и клетки. – 2017. - № 3(12). – С.153-154.
38. Мещанинов В.Н. Метаболизм клеточных структур при старении и стрессе / В.Н.Мещанинов, Д.Л. Щербаков, В.А. Лукаш. – Екатеринбург, ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, - 2017. – 308 с.
39. Наливайко А.М. Пролиферация и миграция лимфоидных клеток тимуса при острой гипоксии и частичной гепатэктомии / А.М.Наливайко, М.В. Попугайло // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 1988. - №4. – С. 32.
40. Никитин К. Д. Белки теплового шока: биологические функции и перспективы применения / К. Д. Никитин // Клиническая онкогематология. – 2008. - № 1(2). – С. 125-130.
41. 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.
42. Осипенко А.В. Иммунобиологические механизмы регенерации тканей / А.В. Осипенко, В.А. Черешнев. – Екатеринбург, УрО РАН, - 1997. – 129 с.

43. Потеряева О. Н. Изучение гепатопротекторного действия растительных экстрактов при экспериментальном повреждении печени / О. Н. Потеряева, Г. С. Русских, В. В. Иванова // Медицина и образование в Сибири. — 2012. — № 4.
44. Практическая гериатрия : сборник избранных клинических и организационных аспектов / под ред. Л.Б. Лазебника. – Москва : Боргес, 2002. – 556 с.
45. Принципы генно-клеточной терапии социальнозначимых заболеваний / О.Г.Макеев, А.В. Коротков, С.В. Костюкова [и др.] // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2014. - № 1(47). – С. 96.
46. Прохорова И.М. Генетическая токсикология : лабораторный практикум / И.М. Прохорова, М.И. Ковалева, А.Н, Фомичева ; ЯрГУ – Ярославль, 2005. – 132 с.
47. Реутов А.А. Возрастные особенности репаративной регенерации печени при трансплантации гепатоцитов и действии метаболически активных факторов : диссертация ... кандидата мед. наук : 14.00.16 / Реутов Андрей Александрович. – Екатеринбург, 2004.- 129 с.
48. Романова Л.К. Регуляция восстановительных процессов / Л.К. Романоваю – М.: Изд-во Моск. Ун-та. – 1984. – С. 113-114.
49. Российский статистический ежегодник 2017 : Стат. сб. / под ред. А.Е. Суринова. – Москва, - 2017. – 686 с.
50. Российский статистический ежегодник 2018 : Стат. сб. / под ред. А.Е. Суринова. – Москва, - 2018. – 694 с.
51. Рудаков В.С. Влияние трансплантации аллогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга на регенерацию печени после обширной резекции в эксперименте / В.С. Рудаков, Р.В. Деев, К.К. Губарев // Гены & Клетки. - 2018. - №2. - С. 77-82.
52. Рудаков В.С. Применение мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в лечении острой печеночной недостаточности после обширной резекции печени в эксперименте / В.С Рудаков, С.Э. Восканян, И.И. Еремин // Гены & Клетки. - 2016. - №4. - С. 70-74.

53. Рудаков В.С. Экспериментальные модели острой печеночной недостаточности / В.С. Рудаков, С.Э. Восканян, И.И. Еремин // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2015. - № 4. – 138-144.
54. Сазонов, С. В. Особенности состояния пролиферативных процессов в условиях возрастной инволюции организма : диссертация ... д-ра мед. наук : 14.00.16 / Сазонов Сергей Владимирович. – Челябинск, 1999.- 372 с.
55. Сташкевич Д. С. Актуальные вопросы иммунологии: система цитокинов, биологическое значение, генетический полиморфизм, методы определения: учебное пособие / Д. С. Сташкевич, Ю. Ю. Филиппова, А. Л. Бурмистрова. — Челябинск : Цицеро. — 82 с.
56. Целуйко С.С. Регенерация тканей : учебное пособие / С.С. Целуйко, Н.П. Красавина, Д.А. Семенов. - Благовещенск: Амурская государственная медицинская академия, 2019. - 136 с.
57. Цвиренко С.В. Состояние регенераторных процессов тканей в условиях воздействия на организм экстремальных факторов : диссертация ... д-ра мед. наук : 14.00.16 / Цвиренко Сергей Васильевич – Челябинск, 1994 – 39 с.
58. Шакирова С.М. Влияние гепатотропных препаратов на морфофункциональное состояние печени крыс при интоксикации четыреххлористым углеродом / С.М. Шакирова, М.Ш. Шаяхметов, Г.Р. 27. Шакирова // Вестник РУДН, серия Агротомия и животноводство. – 2013. - № 4. – С. 49-54.
59. Щастный А.Т. Проблемы и перспективы использования клеточной терапии в лечении патологии печени / А.Т. Щастный, С.А. Сушков, О.Д. Мяделец // Новости хирургии. – 2017. - № 25(2). – С. 183-193.
60. Юшков Б.Г. Клетки иммунной системы и регуляция регенерации / Б.Г. Юшков // Бюллетень сибирской медицины. – 2017. - №16(4). – С. 94-105.
61. Юшков Б.Г. Фундаментальные проблемы клеточных технологий / Б.Г. Юшков // Сборник научных работ. Клеточные технологии — практическому здравоохранению, 2015 / под ред. проф. Леонтьева С.Л. – Екатеринбург, 2015. – 124 с.

62. Ястребов А.П. Старение, перекисное окисление липидов, биовозраст – принципы коррекции, возможности клеточных технологий / А.П. Ястребов, В.Н. Мещанинов // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2007. - № 1. – С. 83.
63. Ястребов А.П. Этиопатогенетические аспекты геронтологии и разработки средств геропротекции / А.П. Ястребов, В.Н. Мещанинов // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2009. - № 2. – С. 207.
64. Abumaree M H. Immunomodulatory Properties of Human Placental Mesenchymal Stem/Stromal Cells / M.H. Abumaree, F.M. Abomaray, M.A. Alshabibi // Placenta. - 2017. - Vol. 59. – P. 87-95.
65. Afshari A. Different approaches for transformation of mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells / A. Afshari, S. Shamdani, G. Uzan // Stem Cell Res Ther. – 2020. – Vol. 11(1). – P. 54.
66. Alfaifi M. Mesenchymal stromal cell therapy for liver diseases / Mohammed Alfaifi, Young Woo Eom, Philip N. Newsome // Journal of Hepatology. – 2018. – Vol.68. – P. 1272-1285.
67. Alwahsh S.M. Liver cell therapy: is this the end of the beginning? / S.M. Alwahsh, H. Rashidi, D.C. Hay // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2018. – Vol. 75(8). – P. 1307-1324.
68. An Antioxidant Combination Improves Histopathological Alterations and Biochemical Parameters in D-Galactosamine Induced Hepatotoxicity in Rats / T. Catal, S. Tunali, S. Bolkent [et al.] // Eur J Biol. – 2017. – Vol. 76(1). – P. 14-19.
69. An efficient protocol to generate placental chorionic plate-derived mesenchymal stem cells with superior proliferative and immunomodulatory properties / Qilin Huang, Yi Yang, Chen Luo [et al.] // Stem Cell Research & Therapy. – 2019. – Vol. 10(301). – P. 1-15.
70. Antoniadou E. Placental Stem Cells / E. Antoniadou, A.L. David // Best Practice & Research: Clinical Obstetrics & Gynaecology. – 2016. - Vol. 31. – P. 13-29.
71. Ballantine E.E. The effect of maternal partial hepatectomy on the fetal liver / E.E. Ballantine // Regeneration in animals and related problems. – 1965. – P. 482-492.

72. Beeravolu N. Isolation and Characterization of Mesenchymal Stromal Cells From Human Umbilical Cord and Fetal Placenta / N. Beeravolu, Ch. McKee, A. Alamri // *The Journal of Visualized Experiments*. - 2017 - Vol. 122.
73. Biological Functions of Mesenchymal Stem Cells and Clinical Implications / A. Naji, M. Eitoku, B. Favier [et al.] // *Cellular and Molecular Life Sciences*. - 2019. - Vol. 76(17). – P. 3323-3348.
74. Boyd A. The role of stem cells in liver injury and repair / A. Boyd, Ph. Newsome, W. Lu // *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*. – 2019. – Vol. 13(7). – P. 623-531.
75. Brown Ch. Mesenchymal Stem Cells: Cell Therapy and Regeneration Potential / Ch. Brown, Ch. McKee, Sh. Bakshi // *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. – 2019. - Vol. 13(9). – P. 1738-1755.
76. Buzhor E. Cell-based Therapy Approaches: The Hope for Incurable Diseases / E. Buzhor, L. Leshansky, J. Blumenthal // *Regenerative Medicine*. – 2014. – Vol. 9(5). – P. 649-672.
77. Casiraghi F. Mesenchymal stromal cells for tolerance induction in organ transplantation / Casiraghi F1, Perico N1, Remuzzi G // *Human Immunology*. – 2018. – Vol. 79(5). – P. 304-313.
78. Castro-Manreza M. Immunoregulation by Mesenchymal Stem Cells: Biological Aspects and Clinical Applications / M. Castro-Manreza, J. Montesinos // *Journal of Immunology Research*. – 2015. – P. 1-20.
79. Chamuleau R. A. F. M. End-stage liver failure: filling the treatment gap at the intensive care unit / R. A. F. M. Chamuleau, R. Hoekstra // *Journal of Artificial Organs*. – 2019.
80. Characteristics of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells From Human Terminal Placenta / Yu.V. Rylova, N.V. Milovanova, M.N. Gordeeva [et al.] // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. - 2017. - Vol. 159(2). – P. 253-257.
81. Christ B. The Therapeutic Promise of Mesenchymal Stem Cells for Liver Restoration / B. Christ, S. Brückner, S. Winkler // *Trends in Molecular Medicine*. - 2016. - Vol. 21(11). – P. 673-686.

82. Clinical trials using mesenchymal stem cells in liver diseases and inflammatory bowel diseases / A. Tsuchiya, Y. Kojima, S. Ikarashi [et al.] // *Inflammation and Regeneration*. – 2017. – Vol. 37(16). – P. 1-15.
83. Cogger V. Preliminary analysis of the sinusoidal endothelium and space of Disse in ageing *Papio hamadrayas* / V. Cogger, A. Warren, R. Fraser // *Comparative Hepatology*. - 2004. - Vol. 3. - P. 26.
84. Comparison of hepatic transcriptome profiling between acute liver injury and acute liver failure induced by acetaminophen in mice / C. Li, Y. Ming, W. Hong [et al.] // *Toxicology Letters*. – 2018. – Vol. 283. – P. 69-76.
85. Comparison of Molecular Profiles of Human Mesenchymal Stem Cells Derived From Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, Placenta and Adipose Tissue / J. S. Heo, Y. Choi, H-S. Kim [et al.] // *International Journal of Molecular Medicine*. – 2016. - Vol. 37(1). – P. 115-125.
86. Concise Review: Isolation and Characterization of Cells from Human Term Placenta: Outcome of the First International Workshop on Placenta Derived Stem Cells / O. Parolini, F. Alviano, G. P. Bagnara [et al.] // *Stem cells*. – 2008. – Vol. – 26. – P. 300-311.
87. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing / G. Chamberlain, J. Fox, B. Ashton [et al.] // *Stem cells*. – 2007. – Vol. – 25. – P. 2739.
88. Concise Review: MSC Adhesion Cascade—Insights into Homing and Transendothelial Migration / F. Nitzsche, Muller C. Lukomska B. [et al.] // *Stem cells*. – 2017. – Vol. – 35. – P. 1446-1460.
89. Crosstalk Between Mesenchymal Stem Cells and T Regulatory Cells Is Crucially Important for the Attenuation of Acute Liver Injury / Marina Gazdic, B. S. Markovic, A. Arsenijevic [et al.] // *Liver transplantation*. – 2018. – 24(5). – P. 687-702.
90. Current Status of Stem Cell Therapies in Tissue Repair and Regeneration / T.K. Giri, A. Alexander, M. Agrawal [et al.] // *Current Stem Cell Research & Therapy*. – 2019. – Vol. 14(2). – P. 117-126.

91. Current Understanding of Stem Cell and Secretome Therapies in Liver Diseases / D. Kim, G.S. Cho, C. Han [et al.] // *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. – 2017. – Vol. 14(6). – P. 653-665.
92. Cytokines in adipose-derived mesenchymal stem cells promote the healing of liver disease / S. Nahar, Y. Nakashima, C. Miyagi-Shiohira [et al.] // *World Journal of Stem Cells*. – 2018. – Vol. 10(11). – P. 146-159.
93. D-galactosamine based canine acute liver failure model / J.F. Patzer, G.D. Bloc, A. Khanna [et al.] // *Hepatobiliary & pancreatic diseases international*. – 2002. – Vol. 1(3). – P. 354-367.
94. Direct Comparison of the Thioacetamide and Azoxymethane Models of Type A Hepatic Encephalopathy in mice / S. Grant, M. McMillin, G. Frampton [et al.] // *The Journal of Liver Research*. – 2018. – Vol. 3. – P. 171-185.
95. Does mesenchymal stem cell improve the liver regeneration after the 70% hepatectomy? / A.K.S. Alves, V. Lanzoni, R. A. Fuziy [et al.] // *Acta Cirurgica Brasiliense*. – 2017. – Vol. 32(7). – P. 515-522.
96. Dong S. Mechanisms of CCl₄-induced liver fibrosis with combined transcriptomic and proteomic analysis / S. Dong, Q. Chen, Y. Song // *The Journal of Toxicological Sciences*. – 2016. – Vol. 4. – P. 561-572.
97. Effect of Carbon Tetrachloride (CCL₄) on Liver in Adult Albino Rats: Histological study / Haytham EL Sayed Ali EL Sayed, Lotfy EL Sayed Morsy, Tamer Mosad Abo Emara [et al.] // *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*. – 2019. – Vol. 76(6). – P. – 4254-4261.
98. Effects of aging on liver microcirculatory function and sinusoidal phenotype / R. Maeso-Díaz, M. Ortega-Ribera, A. Fernández-Iglesias [et al.] // *Aging Cell*. – 2018. – P. 1-14.
99. Evaluating the Best Time to Intervene Acute Liver Failure in Rat Models Induced by D-Galactosamine / L. P. de Carvalho Batista Éboli, A. A. Salzedas Netto, R. A. de Azevedo [et al.] // *Acta Cirúrgica Brasileira*. – 2016. – Vol. 131(12). – P. 783-792.

100. Evaluation of Safety for Hepatectomy in a Novel Mouse Model With Nonalcoholic-Steatohepatitis / Y. Ozawa, T. Tamura, Y. Owada [et al.] // *World Journal of Gastroenterology*. – 2018. – Vol. 24(15). – P. 1622-1631.
101. Fausto N. Liver regeneration / N. Fausto, J. Campbell, K. Riehle // *Hepatology*. - 2006. - Vol. 43(1). - P. 45-53.
102. Feng L.Y. Clinical application of mesenchymal stem cells in treatment of acute-on-chronic liver failure and related research advances / L.Y. Feng , D.Z. Zhang // *Chinese Journal of Hepatology*. – 2017. - Vol. 25(9). – P. 651-654.
103. Fisch S. C. Pluripotent nontumorigenic multilineage differentiating stress enduring cells (Muse cells): a seven-year retrospective / S. C. Fisch, M. L. Gimeno, J. D. Phan // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2017. Vol. 8. – P. 1-9.
104. Forbes S. J. Liver Regeneration - Mechanisms and Models to Clinical Application / S. J. Forbes, Ph. N. Newsome // *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. – 2016. – Vol. 13(85). – P. 473-485.
105. Gagliano N. Mechanisms of aging and liver functions / N. Gagliano, F. Grizzi, G. Annoni // *Digestive Diseases*. - 2007. - Vol. 25(2). – P. 118-123.
106. Gilgenkrantz H. Understanding Liver Regeneration From Mechanisms to Regenerative Medicine / H. Gilgenkrantz, A. C. de l'Hortet // *The American Journal of Pathology*. – 2018. - Vol. 188(6). - P. 1316-1327.
107. Greenbaum L. E. Clinical translation of liver regeneration therapies: a conceptual road map / L. E.Greenbaum, C. Ukomadu, J. S.Tchorz // *Biochemical Pharmacology*. – 2020.
108. Hallmarks of Aging in the Liver / N. J. Hunta, S. W. Kanga, G.P. Lockwooda [et al.] // *Computational and Structural Biotechnology Journa*. – 2019. – Vol. 17. – P. 1151-1161.
109. Hepatic NF- κ B-inducing kinase (NIK) suppresses mouse liver regeneration in acute and chronic liver diseases / Yi Xiong, A. Torsoni, Wu Feihua [et al.] // *eLife*. - 2018. - Vol. 7. - P. 1-18.
110. Hepatic pseudocapillarization in aged mice / A. Warren, P. Bertolino, V. Cogger [et al.] // *Exp Gerontol*. – 2005. - Vol. 40 (10). - P. 807-12.

111. Higgins G. Anderson R. Experimental pathology of the liver / G. Higgins, R. Anderson // Archives of Pathology. – 1931. - Vol. 12. - P. 186-202.
112. Hu C. Improvement of mesenchymal stromal cells and their derivatives for treating acute liver failure / C. Hu & L. Li // Journal of Molecular Medicine. – 2019. – Vol. 97. – P. 1065-1084.
113. Hu C. Preconditioning influences mesenchymal stem cell properties in vitro and in vivo / Chenxia Hu, Lanjuan Li // Journal of Cellular and Molecular Medicine. – 2018. – Vol. 22(3). – P. 1428-1442.
114. Hu C. The immunoregulation of mesenchymal stem cells plays a critical role in improving the prognosis of liver transplantation / C. Hu , L. Li // Journal of Translational Medicine. – 2019. – Vol. 17(1). P. 412.
115. Hua, Fu. CCL4 promotes the cell proliferation, invasion and migration of endometrial carcinoma by targeting the VEGF-A signal pathway / Fu Hua, Ye Tian // Int J Clin Exp Pathol. – 2017. – Vol. 10(11). – P. 11288-11299.
116. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Protect Against SCA3 by Modulating the level of 70 kD Heat Shock Protein / T. Li, Y. Liu, L Yu [et al.] // Cellular and molecular neurobiology. – 2018. – Vol 38. – P. 641-655.
117. Human Umbilical Cord MSC-Derived Exosomes Suppress the Development of CCl4-Induced Liver Injury through Antioxidant Effect / Wenqian Jiang, Youwen Tan, Mengjie Cai [et al.] // Hindawi. – 2018. - P. 1-11.
118. Hung A. Hepatocellular carcinoma in the elderly: meta-analysis and systematic literature review / A. Hung, J. Guy // World Journal of Gastroenterology. – 2015. - Vol. 21(42). - P. 12197-12210.
119. Immunomodulatory Functions of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Engineering / H. Li, S. Shen, H. Fu, [et al.] // Stem Cells International. – 2019. – P. 1-18.
120. Insights Into Inflammatory Priming of Mesenchymal Stromal Cells: Functional Biological Impacts / M. Najar, M. Krayem, M. Merimi [et al.] // Inflammation Research. - 2018. - Vol. 67(6). – P. 467-477.

121. Interaction of Multipotent Mesenchymal Stromal and Immune Cells: Bidirectional Effects / E. Andreeva, P. Bobyleva, A. Gornostaeva [et al.] // *Cytotherapy*. - 2017. - Vol. 19(10). – P. 1152-1166.
122. Interleukin-10 secreted by mesenchymal stem cells attenuates acute liver failure through inhibiting pyroptosis / J. Wang, H. Ren, X. Yuan [et al.] // *Hepatology Research*. – 2018. – Vol. 48. – P. 194-202..
123. Ishigami A. Effect of aging on EGF stimulated DNA synthesis and EGF receptor levels in primary cultured rat hepatocytes / A. Ishigami, T. Reed, G. Roth // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1993. - Vol. 196(1). - P. 181-186.
124. Isolation of CD133+ Liver Stem Cells for Clonal Expansion / C. Bart Rountree, Wei Ding, Hein Dang [et al.] // *Journal of Visualized Experiments*. – 2011. – Vol. 56. – P. 1-9.
125. Kholodenko I. V. Cellular mechanisms of liver regeneration and cell-based therapies of liver diseases / I. V. Kholodenko, K.N. Yarygin // *BioMed Research International*. – 2017. – P. 1-17.
126. Kordes C. Stellate cells are mesenchymal stem cells / C. Kordes, I. Sawitza, S. Gotze // *European Journal of Medical Research*. - 2014. - Vol. 19(1). – P. 6.
127. Koti R. Surgical Complications Following Liver Transplant and Their Management / R. Koti, H. Tzerbinis, B. Davidson // *Liver Diseases*. – 2020. – P. 741-756.
128. Kynurenic Acid Protects Against Thioacetamide-Induced Liver Injury in Rats / S. Marciniak, A. Wnorowski, K. Smolińska [et al.] // *Analytical cellular pathology*. – 2018. – P. 1-11.
129. Latest Findings on the Placenta From the Point of View of Immunology, Tolerance and Mesenchymal Stem Cells / K. Macholdová, E. Macháčková, V. Prošková [et al.] // *Ceska Gynekol*. – 2019. - Vol. 84(2). – P. 154-160.
130. Le Blanc K. Mesenchymal Stromal Cells and the Innate Immune Response / K. Le Blanc, L. C. Davies // *Immunology Letters*. - 2015. - Vol. 168(2). – P. 140-146.

131. Li N. Immune cells in liver regeneration / N. Li, J. Hua // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8(2). – P. 3628-3639.
132. Liepelt A. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) as a target in liver diseases / A. Liepelt, F. Tacke // *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. - 2016. - Vol. 311(2). – P. 203-212.
133. Liu J. Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells in chemical-induced liver injury: a high-dimensional analysis / Jingqi Liu, Bing Feng, Yanping Xu [et al.] // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2019. – Vol 10(262). – P. 1-13.
134. Lodes U. Acute Liver Failure. Acute-On-Chronic Liver Failure. Hepatorenal Syndrome. Hepatopulmonary Syndrome and Portopulmonary Hypertension / U. Lodes, D. Jacob, F. // *Meyer Artificial Liver Support on the ICU*. – 2017. - Vol. 142(3). – P. 275-286.
135. Maes M. Experimental models of hepatotoxicity related to acute liver failure / Michaël Maes, Mathieu Vinken, Hartmut Jaeschke // *Toxicology and Applied Pharmacology*. – 2016. – Vol. 290. – P. 86-97.
136. Mahmood A. Stem Cell Transplant for Advanced Stage Liver Disorders: Current Scenario and Future Prospects / A. Mahmood, R. Seetharaman, P. Kshatriya // *Current Medicinal Chemistry*. – 2019. – Vol. 26. – P. 1-16.
137. Marti U. Handling of epidermal growth factor and number of epidermal growth factor receptors are changed in aged male rats / U. Marti // *Hepatology*. - 1993. - Vol. 18(6). - P. 1432-1436.
138. Mawatari S. Acute Liver Failure / Seiichi Mawatari, Yoshinori Harada, Masaki Iwai // *Diagnosis of Liver Disease*. - 2019. – P. 45-50.
139. Mechanobiology of mesenchymal stem cells: Which interest for cell-based treatment? / C. Huselstein , R. Rahouadj , N. de Isla [et al.] // *Bio-Medical Materials and Engineering*. - 2017. - Vol. 28(1). – P. 47-56.
140. Ménard C. Integrated transcriptomic, phenotypic, and functional study reveals tissue-specific immune properties of mesenchymal stromal cells / Cédric Ménard, Joëlle Dulong, David Roulois // *Translational and clinical research*. – 2019. -

141. Mesenchymal Stem Cell-Dependent Modulation of Liver Diseases / M. Gazdic, A. Arsenijevic, B. Markovic [et al.] // *Int J Biol Sci.* – 2017. – Vol. 13(9). – P. 1109–1117.
142. Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic strategy for liver diseases / Guohua Lou, Zhi Chen, Min Zheng [et al.] // *Experimental & Molecular Medicine.* – 2017. – Vol. 49. – P. 1-9.
143. Mesenchymal Stem Cells for Liver Regeneration in Liver Failure: From Experimental Models to Clinical Trials / Maria P. de Miguel, I. Prieto, A. Moratilla [et al.] // *Stem Cells International.* – 2019. – P. 1-12.
144. Mesenchymal Stem Cells Transplantation following Partial Hepatectomy: A New Concept to Promote Liver Regeneration—Systematic Review of the Literature Focused on Experimental Studies in Rodent Models / I. G. Papanikolaou, C. Katselis, K. Apostolou [et al.] // *Stem Cells International.* – 2017. – P. 1-22.
145. Mesenchymal Stem Cells: Identification, Phenotypic Characterization, Biological Properties and Potential for Regenerative Medicine Through Biomaterial Micro-Engineering of Their Niche / J. Kobolak, A. Dinnyes, A. Memic [et al.] // *Methods in Cell Science.* - 2016. - Vol. 99. – P. 62-68.
146. Mesenchymal stem/stromal cells as a delivery platform in cell and gene therapies / Naomi D'souza¹ , Filippo Rossignoli¹ , Giulia Golinelli [et al.] // *BMC Medicine.* – 2015. - Vol. 13. – P. 1-15.
147. Michalopoulos G. Hepatostat: Liver Regeneration and Normal Liver Tissue Maintenance / G. Michalopoulos // *Hepatology.* - 2017. - Vol. 65. - P. 1384-1392.
148. Michalopoulos G. K. Liver Regeneration after Partial Hepatectomy / George K. Michalopoulos // *The American Journal of Pathology.* – 2010. - Vol. 176(1). – P. 2-13.
149. Michalopoulos G. Liver regeneration / G. Michalopoulos // *Cell. Physiol.* - 2007. - Vol. 213. - P. 286–300.
150. Michalopoulos G. Liver regeneration / G. Michalopoulos // *Journal of Cellular Physiology.* - 2007. - Vol. 213(2). - P. 286-300.

151. Mitchell C. A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice / C. Mitchell, H Willenbring // Nature protocols. – 2008. – Vol. 3(7). – P. 1167-1170.
152. Mitchell C. Willenbring H. A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice/ C. Mitchell, H. Willenbring // Nature Protocols. - 2008. - Vol. 3(7). - P. 1167-1170.
153. Molecular Mechanisms of Immunomodulation Properties of Mesenchymal Stromal Cells: A New Insight into the Role of ICAM-1 / Yu. Rubtso, K. Goryunov, A. Romanov [et al.] // Hindawi. – 2017. – P. 1-15.
154. Morsiani C. The peculiar aging of human liver: A geroscience perspective within transplant context / C. Morsiania, M. G. Bacalini, Aurelia Santoro // Ageing Research Reviews. – 2019. – Vol. 51. – P. 24-34.
155. MSC surface markers (CD44, CD73, and CD90) can identify human MSC-derived extracellular vesicles by conventional flow cytometry / Teresa L. Ramos, Luis Ignacio Sánchez-Abarca, Sandra Muntión [et al.] // Cell Communication and Signaling. – 2016. – Vol. 14(2). - P. 2-14.
156. MSC-triggered metabolomic alterations in liver-resident immune cells isolated from CCl₄-induced mouse ALI model / Xiaowei Shi, Jingqi Liu, Deying Chen [et al.] // Experimental Cell Research. – 2019. – Vol. 383(2).
157. Nishizuka S. S. Liver Regeneration Supported by Muse Cells / S. S. Nishizuka, Y. Suzuki, H. Katagiri // Muse cells. – 2018. – P. 219-241.
158. Nucci R. A. B. Liver regeneration and aging: a review / R. A. B. Nucci, A. C. S. Teodoro, E. F. Gama // Journal of morphological sciences. - 2016. – Vol. 33(4). – P. 179-182.
159. Oliveira M. S. Placental-derived Stem Cells: Culture, Differentiation and Challenges / M.S Oliveira, J.B. Barreto-Filho // World J Stem Cells. - 2015. - Vol. 7(4). – P. 169-775.
160. Overexpression of c-Met in bone marrow mesenchymal stem cells improves their effectiveness in homing and repair of acute liver failure / K. Wang , Y. Li , T. Zhu [et al.] // Stem Cell Research & Therapy. – 2017. – Vol. 8(162). – P. 1-10.

161. Owen A. Mesenchymal Stromal Cell Therapy in Liver Disease: Opportunities and Lessons to Be Learnt? / A. Owen, Ph. N Newsome // American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. - 2015. - Vol. 309(10). – P. 791-800.
162. Photoreductive degradation of CCl₄ by UV-Na₂SO₃: influence of various factors, mechanism and application / Z. Wang , W. Liu, H. Chen [et al.] // Environmental technology. – 2019.
163. Polymeri A. Bone Marrow Stromal Stem Cells in Tissue Engineering and Regenerative Medicine / A. Polymeri , W.V. Giannobile, D. Kaigler // Hormone and Metabolic Research. - 2016. - Vol. 48(11). – P. 700-713.
164. Preziosi M. E. Update on the Mechanisms of Liver Regeneration / M. E. Preziosi, S. P. Monga // Seminars in Liver Disease. – 2017. – Vol. 37(2). – P. 141-151.
165. Progress in mesenchymal stem cell–based therapy for acute liver failure / Yong-Hong Wang, Dong-Bo Wu, Bing Chen [et al.] // Stem Cell Research & Therapy. – 2018. – Vol. 9(1). – P. 1-9.
166. Prostaglandin E2 secreted by mesenchymal stem cells protects against acute liver failure via enhancing hepatocyte proliferation // Yang Liu, Haozhen Ren, Jinglin Wang [et al.] // The FASEB Journal. – 2019. – Vol. – 33. – P. 2514-2525.
167. Proteomic Profiling of Native Unpassaged and Culture-Expanded Mesenchymal Stromal Cells (MSC) / E. Moravcikova, E. M. Meyer, M. Corselli [et al.] // Cytometry Part A. - 2018. - Vol. 93(9). – P. 894-904.
168. Rani R. Stellate Cells Orchestrate Concanavalin A-Induced Acute Liver Damage / R. Rani, A. Tandon, J. Wang // The American Journal of Pathology. – 2017. – Vol. 187(9). – P. 2008-2019.
169. Rationale for the Potential Use of Mesenchymal Stromal Cells in Liver Transplantation / M. Vandermeulen, C. Grégoire, A. Briquet [et al.] // World Journal of Gastroenterology. – 2014. – Vol. 20(44). – P. 16418-32.
170. Regev A. Liver disease in the elderly / A. Regev, E. Schiff // Gastroenterology Clinics of North America. – 2001. - Vol. 30(2). - P. 547-563.

171. Sawada N. Hepatocytes from old rats retain responsiveness of c-myc expression to EGF in primary culture but do not enter S phase / N. Sawada // *Experimental Cell Research*. – 1989. - Vol. 181(2). - P. 584-588.
172. Schmucker D. Liver regeneration and aging: a current perspective / D. Schmucker, H. Sanchez // *Current Gerontology and Geriatrics Research*. - 2011. - Vol. 2011. - P. 1-9.
173. Shiota G. Progress in stem cell-based therapy for liver disease / G. Shiota, N. Itaba // *Hepatology Research*. - 2017. - Vol. 47(2). – P. 127-141.
174. Škreb N. Effect of hepatectomy on the growth of the foetal rat liver / N.Škreb, Lj. Hofman, G. Luković // *Experienta*. – 1965. – Vol. 21. – P. 412-413.
175. Squillaro T. Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells: An Update / T. Squillaro, G. Peluso, U. Galderisi // *Cell transplantation*. - 2016. - Vol. 25(5). – P. 829-848.
176. Stem Cell-Based Therapies for Liver Diseases: An Overview and Update / J. Wang , M. Sun , W. Liu [et al.] // *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. – 2019. – Vol. 16(2). – P. 107-118.
177. Stem Cells and Regenerative Medicine: Myth or Reality of the 21th Century / J-F. Stoltz, N. de Isla, Y.P. Li [et al.] // *Stem Cells International*. – 2015. – P. 1-10.
178. Stem Cells Transplantation in the Treatment of Patients with Liver Failure / Y.C. Tao, M.L. Wang, E.Q. Chen [et al.] // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2018. – Vol. 13(3). – P. 193-201.
179. Stromal Cell-Derived Factor-1 Mediates Cardiac Allograft Tolerance Induced by Human Endometrial Regenerative Cell-Based Therapy / X. Lan, G. Wang, X. Xu [et al.] // *Stem Cells Translational Medicine*. - 2017. - Vol. 6(11). – P. 1997-2008.
180. Stromal Derived Factor-1/CXCR4 Axis Involved in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Recruitment to Injured Liver / K. X. Ling, L. Peng, Z. J. Feng [et al.] // *Stem Cells International*. – 2016. – P. 2-10.
181. Sylvester K. Stem cells / K. Sylvester, M. Longaker // *Arch Surg*. - . – 2004. – Vol. – 139. – P. 93-99.

182. Takubo K. Telomere shortening with aging in human liver / K. Takubo // *J. Gerontol A BiolSci Med Sci.* — 2000. — № 55. — P. 533–536.
183. Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism / R. Taub // *Nature Reviews: Molecular Cell Biology.* – 2004. – Vol. 5(10). - P. 836-847.
184. The Cytokine Secretion Profile of Mesenchymal Stromal Cells Is Determined by Surface Structure of the Microenvironment / D. G. Leuning, N. R. M. Beijer, N. A. du Fossé [et al.] // *Scientific Reports.* - 2018. - Vol. 8(1).
185. The hepatic sinusoid in aging and cirrhosis – effects on hepatic substrate disposition and drug clearance / D. Le Couteur, R. Fraser, S. Hilmer [et al.] // *Clin Pharmacokinet.* - 2005. - Vol. 44 (2). - P. 187-200.
186. The utilization of liver transplantation in the management of acute liver failure: comparison between acetaminophen and nonacetaminophen etiologies / K. J. Simpson, C. M. Bates, N. C. Henderson [et al.] // *Liver Transpl.* — 2009.— Vol. 15.— P. 600–609.
187. Thioacetamide-induced liver damage and thrombocytopenia is associated with induction of antiplatelet autoantibody in mice / You-Yen Lin^{1,5}, Chi-Tan Hu, Der-Shan Sun [et al.] // *Scientific Reports.* – 2019. – Vol. 9.
188. Trohatou O. Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Regenerative Medicine: Past, Present, and Future / O. Trohatou, M. G. Roubelakis // *Cellular reprogramming.* - 2017. - Vol. 19(4). – P. 217-225.
189. Van Haele M. Human Liver Regeneration: An Etiology Dependent Process / M. Van Haele, J. Snoeck, T. Roskams // *Molecular sciences.* – 2019. – Vol. 20. – P. 1-16.
190. Volarevic V. Concise Review: Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Acute Liver Failure and Cirrhosis / V. Volarevic, J. Nurkovic, N Arsenijevic // *Stem cells.* – 2014. – Vol. – 32. – P. 2818-2823.
191. Wu Dong-Bo. Stem cell transplantation for the treatment of end-stage liver disease / D. Wu, E. Chen, H. Tang // *World Journal of Hepatology.* – 2018, - Vol. 10(12). – P. 907-910.

192. Yang Hong. Concise Review: The Regulatory Mechanism of Lysine Acetylation in Mesenchymal Stem Cell Differentiation / Hong Yang, Yuexia Liu, Xuanchen Liu // Hindawi. – 2020. – P. 1-11.
193. Yu J.M. Age-related changes in mesenchymal stem cells derived from rhesus macaque bone marrow / Ji Min Yu, Xiyong Wu, Jeffrey M. Gimble // Aging Cell. – 2011. – Vol. 10. – P. 66-79.