

тормозят транскрипцию. Тотальное гипометилирование ДНК с явлениями гиперметилирования отдельных участков генов в процессе старения организма, обуславливает возможность хромосомной нестабильности и реарранжировки, что согласуется с представлениями других исследователей.

3. В данном исследовании было показано, что паттерны метилирования ДНК и ацетилирования гистонов всего генома могут служить в качестве воспроизводимых эпигенетических биомаркеров темпов биологического старения.

4. При оценке результатов метилирования ДНК и ацетилирования гистонов прослеживается конкордантность. С возрастом наблюдаются меньшие темпы ацетилирования и возрастание уровня метилирования, что по-видимому приводит к снижению транскрибирования генов и соответственно выхода специфических белков.

Список литературы:

1. Brabender J., Usabel H., Danenberg K.D. et al. APC gene promoter hypermethylation in non-small cell lung cancer is associated with survival. // 2001. *Oncogene* 20, 3528-3532

2. Bremner R., Du D.C., Connolly-Wilson M., Bridge P., Ahmad K., Mostachifi H., Rushlow D. and Gallie B. Deletion of RB exons 24 and 25 causes low-penetrance retinoblastoma. // 1997. *Hum. Genet.* 61, 559-570

3. Burbee D.C., Forgacs E., Zochbauer-Muller S. et al. Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancer and malignant phenotype suppression. // 2001. *Natl. Cancer Inst.* 93, 691-699

4. Cairns P., Polascik T., Eby Y., Tokino K., et al. Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary human tumors. // 2005. *Nat. Genet.*, 210-212

5. Chan A.O., Kim S.G., Bedeir A. et al. CpG island methylation in carcinoid and pancreatic endocrine tumors. // 2003. *Oncogene* 13, 924-934

6. Chano T., Ikegawa S., Kontani K. Identification of RBI CC1, a novel human gene that can induce RBI in various cells. // 2002. *Oncogene* 21, 1295-1298

7. Choy K., Pang C., To K. et al. Impaired expression and promoter hypermethylation of 06-methylguanine-DNA methyltransferase in retinoblastoma tissues. // 2007. *Inv. Ophthalmol. & Visual Sci.* 43, 1344-1349

8. Islene Araujo de Carvalho. World report on ageing and health. / Islene Araujo de Carvalho // 2016. WHO., 53-77

УДК 61:001.89

Зайцева О.В., Милованкин В.А., Маклакова И.Ю. ВЛИЯНИЕ СОЧЕТАННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГСК+ММСК НА МОРФОМЕТРИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ ПЕЧЕНИ ПОСЛЕ СУБТОТАЛЬНОЙ РЕЗЕКЦИИ.

Кафедра патологической физиологии
Уральский государственный медицинский университет

ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»
Екатеринбург, Российская Федерация

Zaytseva O.V., Milovankin V.A., Maklakova I.Yu.

**EFFECTS OF COMBINED HSC+MMSC TRANSPLANTATION ON LIVER
MORPHOLOGY STATE AFTER SUBTOTAL RESECTION**

Department of pathological physiology

Ural state medical university

Institute of medical cell technologies

Yekaterinburg, Russian Federation

E-mail: zajcevaolga128@gmail.com

Аннотация. Резекция печени – основной метод лечения первичных и метастатических опухолей печени. Целью исследования была оценка регенераторных способностей печени на фоне введения мультипотентных мезенхимальных и гемопоэтических стволовых клеток (ММСК+ГСК) после субтотальной резекции. В эксперименте использовались беспородные мыши самцы в количестве 30 шт. Всех мышей разделили на 2 группы по 15 шт. Производили резекцию $\frac{2}{3}$ печени с последующим введением ММСК и ГСК. В ходе исследования удалось выяснить, что сочетанная трансплантация двух видов клеток (ГСК и ММСК) является многообещающим способом коррекции регенерации тканей. Экспериментальные исследования на лабораторных мышцах позволили выявить достоверно положительные эффекты в восстановлении функции печени.

Annotation. The article deals with liver resection topic which is a basic treatment method in initial and metastatic tumors. The aim of the research was to evaluate liver regeneration abilities after injecting HSC and MMSC after subtotal resection. 30 white non-species male mice were used in experiment. All mice were divided in 2 groups of 15 animals. HSC+MMSC were injected in experimental group after producing $\frac{2}{3}$ liver resection. As a result it became possible to consider that combined cell transplantation (HSC+MMSC) is promising method of correcting tissue regeneration. The experimental research on mice allowed to discover trustworthy positive effects in recovery of liver functional activity.

Ключевые слова: гемопоэтические стволовые клетки, печеночная недостаточность, резекция печени, мезенхимальные стволовые клетки.

Key words: hemopoietic stem cells, liver insufficiency, liver resection, mesenchymal stem cells.

Введение

Резекция печени – основной метод лечения первичных и метастатических опухолей печени. В мире ежегодно выполняется от 101 660 до 234 600 резекций печени, что составляет 5–30% от всех пациентов с данными заболеваниями [1].

Резекция печени у грызунов стала широко используемым методом изучения регенерации печени. Ее просто выполнить с достаточно высокой выживаемостью животных. Процедура может быть легко модифицирована путем изменения объема резецированной печени [2].

Резекция печени может приводить к развитию печеночной недостаточности. Лечение больных с тяжелыми формами печеночной недостаточности (ПН) остается актуальной проблемой современной медицины. Пересадка печени является единственным эффективным способом лечения ПН. Однако трансплантация печени имеет ограниченное применение из-за недостатка донорских органов. Альтернативой этому может стать клеточная трансплантация. [3] Показано, что в качестве клеточных препаратов могут быть использованы мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК), гемопоэтические стволовые клетки (ГСК), что приводит к восстановлению печени реципиента путем дифференцировки трансплантируемых клеток в гепатоциты [4].

ММСК могут влиять на восстановление печени посредством трех механизмов. Первый состоит в восполнении поврежденных и утраченных клеток путем непосредственной дифференцировки в гепатоциты и/или слияния с гепатоцитами. Второй механизм – синтез факторов роста и цитокинов. Третий – прямое и опосредованное воздействие на Т и В лимфоциты, что уменьшает степень активности воспалительного ответа в поврежденной печени [5]. ММСК также обладают иммуносупрессивными свойствами, что снижает вероятность развития иммунологического конфликта и делает возможным проведение аллогенной трансплантации клеток.

Ряд исследований показал, что образование новых гепатоцитов происходит из-за их слияния с ГСК. Предполагается, что так называемые овальные клетки, которые способны участвовать в генерации гепатоцитов и холангиоцитов, являются потомками ГСК, поскольку у них есть общая группа гемопоэтических маркеров. Образованные таким образом клетки печени возникают в результате слияния клеток донорских ГСК и реципиентных гепатоцитов. В дальнейшем это, вероятно, приводит к перепрограммированию геномов ГСК [6].

Цель исследования - оценка морфометрических показателей печени на фоне введения ММСК+ГСК после субтотальной резекции.

Материалы и методы исследования

Исследование проводилась на базе кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России в сотрудничестве с ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий» г.Екатеринбурга.

В исследовании участвовали беспородные мыши самцы в возрасте 7-8 месяцев, массой 25-30 г, в количестве 30 шт. Всех мышей разделили на 2 группы по 15 шт. Производили резекцию $\frac{2}{3}$ печени с последующим введением мультипотентных мезенхимальных и гемопоэтических стволовых клеток. Животным опытной группы внутривенно вводились ММСК и ГСК

соответственно в дозах 4 млн. клеток/кг и 330 тыс. клеток/кг, суспендированные в 0,2 мл 0,9 % раствора NaCl через час после проведения резекции. Животным контрольной группы вводили 0,9 % раствор NaCl — 0,2 мл внутривенно. Клетки были выделены из хориона плаценты беременных самок. Продолжительность исследования 2 месяца. По 5 мышей каждой группы выводили из эксперимента на 1, 3 и 7 сутки после операции.

Резекция проводилась по методике Claudia Mitchell, Holger Willenbring [6]. Для анестезии использовались препараты: Ксилазин (Ксила) 20 мг/ мл, Золазепам+тилетаминам (Золетил 100) 990 мг. Шприц, объемом 1 мл наполняли 0,07 мл препаратом Ксила и 0,07 мл препаратом. Далее заполняли шприц до 1 мл 0,9 % раствором NaCl и вводили внутримышечно 0,08 мл раствора.

Производилась оценка следующих морфометрических показателей печени: количество гепатоцитов на 1 мм², площадь гепатоцитов, площадь ядра гепатоцита, площадь цитоплазмы гепатоцита = площадь гепатоцита – площадь ядра гепатоцита, ядерно-цитоплазматический индекс (ЯЦИ), количество двуядерных гепатоцитов на 1 мм², митотический индекс (МИ), апоптотический индекс (АИ). Ядерно-цитоплазматический индекс (ЯЦИ) определяли, как отношение ядра и цитоплазмы клетки. Митотический, апоптотический индексы, выражали в промилле (‰). Митотический индекс определялся как отношение числа клеток в состоянии митоза к общему числу подсчитанных гепатоцитов. Верификация выраженности апоптоза осуществлялась с использованием метода ApopTag® Peroxidase In Situ Oligo Ligation (ISOL) (Millipore, США). Апоптотический индекс определялся как отношение числа клеток в состоянии апоптоза к общему числу подсчитанных гепатоцитов.

Результаты исследования и их обсуждение

На первые сутки после резекции печени в контрольной и опытной группах показатели площади гепатоцитов, площади ядра, площади цитоплазмы гепатоцитов, ЯЦИ, количества двуядерных гепатоцитов и АИ достоверно выше интактных значений. Это говорит об активных пролиферативных процессах. В пределах опытной и контрольной групп показатели между собой достоверно не отличаются.

На третьи сутки после резекции показатели площади ядра гепатоцитов, ЯЦИ, количества двуядерных гепатоцитов и АИ у группы с ММСК+ ГСК были достоверно выше по сравнению с контрольной группой вследствие стимуляции стволовыми клетками регенеративных процессов печени (таблица).

Таблица 1

Морфометрические показатели печени зрелых лабораторных мышей на 3 сутки после резекции печени на фоне введения ММСК и ГСК, М±m, n = 5

Показатели	Значение		
	NaCl	ММСК+ГСК	Интактные мышь

Количество гепатоцитов на 1 мм ²	2489,91±66,89 *	2557,0±77,71 *	1567,57±55,92
Площадь гепатоцитов, мкм ²	331,81±24,02 *	338,0±20,57 *	264,90±6,60
Площадь ядра гепатоцитов, мкм ²	67,13±7,01 *	84,0±8,29 * **	50,57±3,80
ЯЦИ	0,27±0,01*	0,33±0,02 * **	0,24±0,03
Количество двуядерных гепатоцитов на мм ²	380,97±10,15 *	473,14±23,55 * **	233,43±12,2
МИ, %	8,1±0,60 *	8,2±0,49 *	0,76±0,07
АИ, %	2,13±0,20*	1,59±0,13* **	0,41±0,05

Примечание: * отличие от интактной подгруппы зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$; ** отличие от контрольной подгруппы зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$

На седьмые сутки после резекции печени у группы ММСК+ГСК показатели количества гепатоцитов, площади ядра, количества двуядерных гепатоцитов, МИ и АИ были достоверно выше значений контрольной группы, что также связано с регенеративными процессами в печени (таблица 2).

Таблица 2

Морфометрические показатели печени зрелых лабораторных мышей на 7 сутки после резекции печени на фоне введения ММСК и ГСК, $M \pm m$, $n = 5$

Показатели	Значение		
	NaCl	ММСК+ГСК	Интактные мыши
Количество гепатоцитов на 1 мм ²	1918,29±82,04 *	2330,14±112,98* **	1567,57±55,92
Площадь ядра гепатоцитов, мкм ²	63,39±5,12 *	78,07±6,32* **	50,57±3,80
ЯЦИ	0,29±0,02 *	0,37±0,01* **	0,24±0,03
Количество двуядерных гепатоцитов на мм ²	320,77±10,64 *	392,43±20,94* **	233,43±12,2
МИ, %	4,51±0,47 *	5,74±0,49* **	0,76±0,07

АИ, ‰	1,25±0,09*	0,92±0,09* **	0,41±0,05
--------------	-------------------	----------------------	------------------

Примечание: * отличие от интактной подгруппы зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$; ** отличие от контрольной подгруппы зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

Выводы

Данные морфометрии показывают, что уже на первые сутки в печени активизировались регенераторные процессы, связанные как с пролиферацией внутриклеточных структур, так и с увеличением количества гепатоцитов. Экспериментальные исследования на лабораторных мышах позволили выявить достоверно положительные эффекты в регенераторной функции печени. Однако необходимы более детальные исследования в отношении раскрытия механизмов действия ГСК и ММСК на гепатоциты, что в результате может стать предпосылкой для разработки клеточной терапии при заболеваниях печени.

Список литературы:

1. Рудаков, В.С. Применение мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в лечении острой печеночной недостаточности после обширной резекции печени в эксперименте / В.С. Рудаков, С.Э. Восканян, И.И. Еремин, и др // Гены и клетки. - 2016. - Т. 9, № 4. - С. 70-74
2. Лызиков, А.Н. Механизмы регенерации печени в норме и при патологии / А.Н Лызиков, А.Г. Скуратов, Б. Б. Осипов // Проблемы здоровья и экологии. - 2015. - № 1(43). - С. 4-9
3. Лызиков, А.Н. Роль стволовых клеток в регенерации печени и перспективы их использования в лечении печеночной недостаточности (обзор литературы) / А.Н. Лызиков, А.Г. Скуратов, Е.В. Воропаева др. // Проблемы здоровья и экологии. - 2012. - № 2(32). - С. 7-13
4. Косых, А.А. Влияние ММСК и ГСК на показатели периферической крови и гемостаза у крыс с хроническим гепатитом. / А.А. Косых, А.А. Марченков, М.К. Селезнев, А.А. Осипов и др. // Журнал научных статей здоровье и образование в XXI веке. – 2014. – Т. 16, № 3, - С.24-28
5. Pilat, N. Implication for Bone Marrow Derived Stem Cells in Hepatocyte Regeneration after Orthotopic Liver Transplantation / N. Pilat, L. Unger, G. A. Berlakovich // International Journal of Hepatology. - 2013. - Vol.53, Issue 3
6. Mitchell, C. A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice/ C. Mitchel, H. Willenbring // Nature Protocols. - 2008. - Vol.3, No.7. P. 1167-1171

УДК: [612.821.44:616-092.9]+615.03(575.2)(04)

**Зубарева А.С., Петров В.М., Горохова Г.И., Прощенко Д.А.,
Копосова О.В.**