

**Султанова Д.А.¹, Маклакова И.Ю.^{1,2}, Гребнев Д.Ю.^{1,2}.
ВЛИЯНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК И ИХ ЛИЗАТА НА
РЕГЕНЕРАЦИЮ ПЕЧЕНИ ПРИ ЧАСТИЧНОЙ ГЕПАТЭКТОМИИ
ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ**

Кафедра патологической физиологии

¹ - Уральский государственный медицинский университет

² - ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»
Екатеринбург, Российская Федерация

**Sultanova D.A, Maklakova I.Yu, Grebnev D.Yu.
EFFECT OF MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELL
TRANSPLANTATION AND THEIR LYSATE ON LIVER REGENERATION
IN PARTIAL HEPATECTOMY OF LABORATORY ANIMALS**

Department of Pathological Physiology

¹ - Ural State Medical University

² - Institute of medical cell technologies
Yekaterinburg, Russian Federation

E-mail: dina.s01@mail.ru

Аннотация. Целью данного исследования было изучить влияние аллогенной трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных (ММСК), а также лизата этих клеток на регенерацию печени после частичной гепатэктомии. Исследования проводились на лабораторных животных зрелого возраста. После частичной резекции печени по методике С. Mitchell и Н. Willenbring двум опытным группам мышей в латеральную хвостовую вену вводили ММСК и продукты распада этих клеток в количестве по 120 тысяч кл/мышь. Оценка репаративной регенерации печени проводилась на 7 сутки после введения клеток путем анализа морфометрических показателей печени и биохимических показателей периферической крови.

Annotation. The aim of this study was to study the effect of allogeneic transplantation of multipotent mesenchymal stromal cells (MMSCs), as well as the lysate of these cells, on liver regeneration after partial hepatectomy. The studies were conducted on mature laboratory animals. After partial resection of the liver by the method of С. Mitchell and Н. Willenbring, two experimental groups of mice were injected into the lateral caudal vein with MMSCs and the products of the decay of these cells in an amount of 120 thousand cells / mouse. The assessment of the reparative regeneration of the liver was carried out on the 7th day after the introduction of cells

by analyzing the morphometric parameters of the liver and the biochemical parameters of peripheral blood.

Ключевые слова: частичная гепатэктомия, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, клеточный лизат, регенерация печени.

Keywords: partial hepatectomy, multipotent mesenchymal stromal cells, cell lysate, liver regeneration.

Введение

Печень - орган с высокими регенеративными возможностями. Частичная гепатэктомия является привлекательной моделью для исследования механизмов репаративной регенерации печени [3]. С развитием клеточной медицины стало возможным применение биомедицинских клеточных продуктов в лечении пострезекционной печеночной недостаточности, в частности мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК).

ММСК – это прилипающие к пластику фибробластоподобные клетки, которые могут дифференцироваться в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях [1,3]. Кроме того, ММСК участвуют в регенерации печени, высвобождая цитокины, такие как фактор роста гепатоцитов (HGF), фактор роста фибробластов (FGF), IL-6, TGF- α , которые эффективно усиливают пролиферацию гепатоцитов [5]. ММСК не экспрессируют маркеры гемопоэтических клеток, но экспрессируют CD90, CD73, CD105, CD29. В качестве источников мультипотентных МСК могут использоваться костный мозг, жировая ткань, плацента, пуповинная кровь, пульпа зуба [2]. Также они обладают иммуносупрессивными свойствами [3], секретируя большое число растворимых факторов, таких как индоламин-2,3-диоксеназа, PG-E2, IL-10, TGF- β , оксид азота, белок-индуцибельный фактор- индуцируемый опухолевым геном 6 (TSG-6). ММСК способны ингибировать активацию комплемента, подавлять пролиферацию Т- и В-лимфоцитов, НК-клеток, менять соотношение между различными субпопуляциями Т-клеток, индуцировать пролиферацию регуляторных Т-клеток. [1].

В ряде исследований говорится о способности лизата ММСК костного мозга активировать регенерацию печени [2]. В связи с этим возникает вопрос: есть ли необходимость введения жизнеспособных клеток? Лизат – это бесклеточный экстракт, образовавшийся после разрушения клеток ферментативным путем [2]. В настоящем исследовании изучена способность жизнеспособных плацентарных ММСК, а также лизата плацентарных ММСК влиять на митотическую активность и апоптоз гепатоцитов. Показано изменение массы печени после трансплантации ММСК и их лизата.

Цель исследования - оценка морфометрических и биохимических показателей печени на фоне введения ММСК и лизата этих клеток после частичной гепатэктомии.

Материалы и методы исследования

Эксперименты проведены на 28 белых мышах-самцах возраста 6-8 месяцев, массой 26-28 г. Получение культуры ММСК осуществлялось из хориона плаценты 3 мышей-самок возраста 3–4 месяца, срок гестации - 18 дней.

Мышей содержали в стандартных условиях вивария ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России. Животные содержались при температуре 18 - 20,5°C, при естественном световом цикле, на стандартной диете, при свободном доступе к воде и пище. В эксперимент отбирали только здоровых животных, прошедших двухнедельную адаптацию к условиям вивария.

Выделение культуры ММСК осуществлялось согласно модифицированному методу Тепляшина А.С. с соавторами - 2004 г. Культивирование проводилось в условиях CO₂ инкубатора при 37°C в увлажненной атмосфере с содержанием углекислого газа 5 %. Смену питательной среды производили каждые 3-4 суток.

Были выделены две опытные и контрольная группы мышей. Первой опытной группе производилось введение в хвостовую вену ММСК в дозе 120 тыс. кл /мышь. Второй опытной группе вводился лизат ММСК, полученный из клеток, в количестве 120 тыс. Частичная гепатэктомия проводилась по методу С. Mitchell и Н. Willenbring. Для анестезии использовался препарат «Золетил» 10 мг/кг (Virbac, Франция). Клетки и клеточный лизат были суспендированы в 0,2 мл 0,9 % раствора NaCl. Каждой опытной группе животных соответствовала контрольная группа, которой производилось введение 0,2 мл 0,9 % раствора NaCl. Введение клеток и лизата осуществлялось через 1 час после частичной гепатэктомии. Также была выделена группа сравнения – животные без моделирования частичной гепатэктомии, которым вводилось 0,2 мл 0,9 % раствора NaCl. В каждой группе было по 7 лабораторных мышей.

Производилась оценка биохимических показателей сыворотки крови (альбумин, АСТ, АЛТ, щелочная фосфатаза), массы печени на 7 сутки после введения клеток. Также производился подсчет митотического (МИ) и апоптотического индексов (АИ). МИ и АИ рассчитывались путем отношения клеток, находящихся в состоянии митоза и апоптоза соответственно к 1000 подсчитанных гепатоцитах. Уровень выраженности апоптоза гепатоцитов был определен путем подсчета апоптотического индекса (АИ) с использованием набора первичных и вторичных антител на гистологических срезах продольной ориентации по идентификации эффекторной каспазы -3 (Caspase-3) (Santa Cruz Biotech, USA).

Имунофенотипирование 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).

Клеточный экстракт готовили с помощью лизирующего буфера (Cell Extraction Buffer, Abcam, Великобритания)

С помощью набора HGF Mouse ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (Abcam) методом иммуноферментного анализа осуществлялось количественное измерение HGF (фактор роста гепатоцитов) в сыворотке крови. Статистический анализ проведен с помощью программного пакета SPSS Statistics (версия 17.0). Оценку различий показателей групп проводили по Т-критерию Стьюдента с учетом поправки Бонферонни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

При изучении морфометрических показателей печени после резекции у зрелых мышей на фоне трансплантации ММСК выявлено восстановление массы печени до значений нормы. Введение ММСК обеспечило увеличение массы печени по сравнению с контрольной группой на 20,8 % ($p < 0,05$). Восстановление массы печени обусловлено влиянием трансплантируемых клеток на пролиферативную активность и апоптоз гепатоцитов. Так, было выявлено повышение митотического индекса на 27,7 % ($p < 0,05$) и снижение запрограммированной клеточной гибели гепатоцитов на 24,8 % ($p < 0,05$). После введения лизата ММСК установлено отсутствие значимого изменения изучаемых показателей (таблица 1).

Таблица 1

Морфометрические показатели печени лабораторных мышей после резекции печени на фоне введения ММСК и клеточного лизата ММСК.

		Масса печени, г	МИ,	АИ,
Частичная гепатэктомия	ММСК	2,03±0,16**	5,76± 0,49* **	0,94±0,07* **
	Клеточный лизат	1,83±0,12*	4,91±0,38*	1,08±0,07*
	NaCl	1,68±0,11*	4,51±0,47*	1,25±0,09*
без частичной гепатэктомии	NaCl	2,18±0,11	0,73±0,06	0,39±0,03

Примечание: * отличие от группы сравнения, достоверно с $p < 0,05$; ** отличие от контрольной группы, достоверно с $p < 0,05$.

Анализируя биохимические показатели в сыворотке крови на 7 сутки после введения клеток, обнаружено, что трансплантация ММСК не оказывала существенного влияния на уровень альбумина. В настоящем исследовании установлено снижение уровня показателей цитолиза гепатоцитов (по сравнению с контрольной группой): АСТ на 48,6 %, АЛТ на 58,8 %, а также ЩФ на 29,3%. Выявленные изменения можно объяснить продукцией ММСК противовоспалительных цитокинов.

Введение жизнеспособных клеток способствует активации пролиферации и дифференцировки клеток печени Ито, которые способны вырабатывать HGF.

Уровень фактора роста гепатоцитов в сыворотке крови повысился на 22,9 % по сравнению с контрольной группой (таблица 2).

Таблица 2

Биохимические показатели крови лабораторных мышей после резекции печени на фоне трансплантации ММСК и лизата клеток ММСК.

		HGF	АЛТ	АСТ	ЩФ	альбумин
Частичная гепатэктомия	ММСК	13,0± 1,02* **	86,34± 7,52**	103,57± 12,42**	64,23± 6,00**	23,13± 2,32*
	Клеточн ый лизат	10,11± 0,52	144,1± 15,22*	162,6± 16,01*	79,6± 6,83*	22,6±2,1*
	NaCl	10,58± 0,88*	137,10± 16,29*	153,86± 16,96*	83,11± 5,93*	20,59± 1,90*
Без частичной гепатэктомии	NaCl	4,49± 0,39	89,23± 4,43	104,56± 9,07	63,30± 4,00	31,41± 3,38

Примечание: * отличие от группы сравнения, достоверно с $p < 0,05$; ** отличие от контрольной группы, достоверно с $p < 0,05$.

Выводы

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о способности ММСК повышать митотическую активность гепатоцитов, ингибировать их запрограммированную клеточную гибель, а также восстанавливать массу печени после частичной гепатэктомии. В то время как лизат плацентарных ММСК не оказывает значимого влияния на изучаемые показатели регенерации печени. Выявленные изменения можно объяснить способностью ММСК к выработке фактора роста стволовой клетки (SCF), который повышает пролиферативную активность клеток печени Ито и запускает их дифференцировку в гепатоциты. Клетки печени Ито являются основным источником выработки другого фактора роста – фактора роста гепатоцитов. HGF является мощным митогеном для гепатоцитов, обладает антиапоптогенным действием. Способность ММСК к выработке противовоспалительных факторов обеспечило снижение активности в сыворотке крови маркеров цитолиза (АЛТ и АСТ), а также маркера холестаза (ЩФ). Следует также отметить отсутствие существенного влияния на белок синтетическую функцию печени трансплантируемых ММСК на 7 сутки после частичной гепатэктомии. На основании проведенного исследования можно сделать вывод, что именно жизнеспособные ММСК оказывают влияние на активацию регенерации печени, а не продукты их распада.

Список литературы:

1. Кузьмина Л.А. Применение мультипотентных мезенхимных стромальных клеток для лечения острой реакции «трансплантат против хозяина»/ Кузьмина Л.А, Петинати Н.А, Васильева В.А [и др.]// Терапевтический архив. - 2020. - №7.- с. 23-30.

2.Chenxia Hu. Transplantation of mesenchymal stem cells and their derivatives effectively promotes liver regeneration to attenuate acetaminophen-induced liver injury/ Chenxia H, Lingfei Zh, Zhongwen Wu [et al] // Stem Cell Research & Therapy. - 2020. - № 11(88). - P.1-11.

3.Mitchell C. A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice/ Mitchell C, Willenbring H// Nature protocols. - 2008.-№ 3 (7). - P. 1167-1171.

4.Reenam S.A. Comparison of Phenotypic and Functional Properties of Mesenchymal Stromal Cells and Multipotent Adult Progenitor Cells / Reenam S. Newsome Kh and Ph // Frontiers in Immunology. - 2019. - №10. - P.1-16.

5.Boyce S. A detailed methodology of partial hepatectomy in the mouse / Boyce S., Harrison D [et al] // Lab animal. - 2008. - № 37 (11). - P. 529-532.

УДК 616.857-084

**Сурганов С.С., Жукова А.А.
ИЗУЧЕНИЕ СУЩЕСТВУЮЩИХ СПОСОБОВ ПРОФИЛАКТИКИ
ПРИСТУПОВ МИГРЕНИ**

Кафедра нормальной и патологической физиологии
Гомельский государственный медицинский университет
Гомель, Республика Беларусь

**Surganov S.S., Zhukova A.A.
INVESTIGATION OF EXISTING METHODS OF PREVENTING
MIGRAINE**

Department of Normal and Pathological Physiology
Gomel State Medical University
Gomel, Republic of Belarus

E-mail: stas.surganov@inbox.ru

Аннотация. В статье рассмотрены различные способы профилактики мигрени с целью выявить наиболее эффективные. Анализ существующих исследований показал, что на данном этапе пока нельзя еще выделить единый конкретный метод, а выбор лекарственного средства должен рассматриваться индивидуально для каждого больного с учетом эффективности, переносимости и безопасности.

Annotation. The article considers various methods of migraine prevention in order to identify the most effective ones. Analysis of existing studies showed that at the present stage it is still impossible to single out one specific method and the choice of a medicament should be considered individually for each patient, taking into account