

© Коллектив авторов, 2021

УДК 616-092.19

Маклакова И.Ю.^{1,2}, Цвиренко С.В.¹, Базарный В.В.¹, Гребнев Д.Ю.¹

Влияние сочетанной трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и звездчатых клеток печени на морфофункциональное состояние печени после введения CCl₄

¹ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России,

620028, Екатеринбург, Россия, ул. Репина, д. 3;

²ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»,

620026, Екатеринбург, Россия, ул. Карла Маркса, д. 22 А

Цель исследования – изучение влияния сочетанной трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных и звездчатых клеток печени на морфофункциональное состояние печени после ее токсического повреждения, вызванного введением CCl₄.

Задачи исследования:

1. Оценка морфометрических показателей печени после сочетанного введения мультипотентных мезенхимальных стромальных (ММСК) и звездчатых клеток печени (ЗКП) при токсическом повреждении печени CCl₄.

2. Изучение влияния котрансплантации ММСК и ЗКП на биохимические показатели крови при токсическом повреждении печени CCl₄.

3. Исследование активности системы репарации ДНК после введения ММСК и ЗКП при токсическом повреждении печени CCl₄.

Методика. Эксперименты выполнены на 63 белых лабораторных мышах-самцах в возрасте 7-8 мес. Токсический гепатит воспроизводили у всех животных внутрибрюшинным введением CCl₄ (50 мкл/мышь), затем из них формировали опытную и контрольную группы. Животным опытной группы в латеральную хвостовую вену вводили суспендированные в 0,2 мл 0,9 % раствора NaCl ММСК, полученные из хориона плаценты мышей-самок (4 млн клеток/кг, 120 тыс клеток/мышь), и ЗКП – 9 млн клеток/кг (270 тыс клеток/мышь). Животным контрольной группы вводили в латеральную хвостовую вену 0,2 мл 0,9 % раствора NaCl. Внутривенные инъекции осуществляли однократно через 1 ч после введения CCl₄. Использовали ММСК 3-го пассажа. Трансплантированные ЗКП не подвергались культивированию. Исследовали влияние сочетанной трансплантации ММСК и ЗКП на морфофункциональное состояние печени на 1-е, 3-и, 7-е сут после введения CCl₄.

Результаты. Сочетанная трансплантация мультипотентных мезенхимальных стромальных и звездчатых клеток печени при токсическом поражении печени приводит к повышению митотической активности гепатоцитов, увеличению числа двуядерных гепатоцитов, повышению ядерно-цитоплазматического отношения. Введение стволовых клеток способствует снижению запрограммированной клеточной гибели гепатоцитов за счет повышения активности ферментов репарации семейства PARP.

Заключение. Сочетанная трансплантация ММСК и ЗКП положительно влияет на морфофункциональное состояние печени в условиях ее токсического повреждения. Значимым механизмом восстановления морфофункционального состояния печени можно считать влияние трансплантируемых ММСК и ЗКП на систему репарации клеток.

Ключевые слова: токсическое повреждение печени; мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки; звездчатые клетки печени; апоптоз; морфофункциональное состояние печени

Для цитирования: Маклакова И.Ю., Цвиренко С.В., Базарный В.В., Гребнев Д.Ю. Влияние сочетанной трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и звездчатых клеток печени на морфофункциональное состояние печени в условиях ее токсического повреждения *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2021; 65(3): 48-55.

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.03.48-55

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Базарный В.В., Маклакова И.Ю., Цвиренко С.В.; сбор и обработка материала – Маклакова И.Ю., Гребнев Д.Ю.; подготовка иллюстративного материала – Базарный В.В., Маклакова И.Ю.; статистическая обработка – Маклакова И.Ю., Гребнев Д.Ю.; написание текста – Маклакова И.Ю., Цвиренко С.В.; редактирование – Цвиренко С.В., Гребнев Д.Ю.

Для корреспонденции: Маклакова Ирина Юрьевна, e-mail: makliu@mail.ru

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке государственного задания «Разработка технологии использования сочетанной трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и звездчатых клеток печени для активации регенерации печени в условиях ее повреждения», номер регистрации 121032500021-1 от 25.03.2021 г.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 09.09.2020

Принята к печати 30.06.2021

Опубликована 30.09.2021

Maklakova I.Yu.^{1,2}, Tsvirenko S.V.¹, Bazarnyi V.V.¹, Grebnev D.Yu.¹

Effect of combined transplantation of multipotent mesenchymal stromal cells and stellate liver cells on the morpho-functional state of the liver after administration of CCL₄

¹Ural State Medical University,

Repin St. 3, Ekaterinburg 620028, Russian Federation;

²Institute of Medical Cell Technologies,

Karla Marksa St. 22 A, Ekaterinburg 620026, Russian Federation

The aim of this study was to investigate the effect of combined transplantation of multipotent mesenchymal stromal and stellate liver cells on the morphofunctional state of the liver after toxic damage caused by carbon tetrachloride.

Objectives of the study:

1. To evaluate changes in liver morphometric parameters after combined administration of multipotent mesenchymal stromal cells (MMSC) and hepatic stellate cells (HSC) in toxic liver damage.
2. To study the effect of cotransplantation of MMSC and HSC on changes in blood biochemical parameters in toxic liver damage.
3. To investigate the activity of the DNA repair system after the introduction of MMSC and HSC in toxic liver damage.

Methods. The experiments were performed on 63 white laboratory male mice aged 7-8 mos. Toxic hepatitis was caused by intraperitoneal administration of carbon tetrachloride (CCl₄) at a dose of 50 µl/mouse. The mice were divided into experimental and control groups. Animals of the experimental group were injected into the lateral caudal vein with MMSCs obtained from the chorion of the placenta of female mice and with HCP at doses of 4 million cells/kg (120 thousand cells/mouse) and 9 million cells/kg (270 thousand cells/mouse), respectively, suspended in 0.2 ml of 0.9% NaCl solution. Animals of the control group were injected with 0.2 ml 0.9 % NaCl into the lateral caudal vein. Intravenous injections were performed 1 hr after the administration of carbon tetrachloride. Rats were administered with MMSCs of the third passage. Transplanted HSC had not been subjected to cultivation. The effect of combined MMSC and HSC transplantation on the morpho-functional state of the liver was studied on the 1st, 3rd, and 7th days after administration of carbon tetrachloride.

Results. The combined transplantation of multipotent mesenchymal stromal and hepatic stellate cells leads to an increase in the mitotic activity of hepatocytes, an increase in the number of binuclear hepatocytes, and an increase in the nuclear-cytoplasmic ratio. Administration of stem cells helps to reduce the programmed cell death of hepatocytes by increasing the activity of repair enzymes of the PARP family.

Conclusion. Combined transplantation of MMSC and hepatic stellate cells (HSC) has a positive effect on the morphofunctional state of the liver in conditions of its toxic damage. A significant mechanism for the restoration of the morphological and functional state liver, the effect of transplanted MMSC and HSC on the cell repair system can be considered.

Keyword: toxic liver damage; multipotent mesenchymal stromal cells; hepatic stellate cells; morpho-functional state of the liver; apoptosis

For citation: Maklakova I.Yu., Tsvirenko S.V., Bazarnyi V.V., Grebnev D.Yu. Effect of combined transplantation of multipotent mesenchymal stromal cells and stellate liver cells on the morpho-functional state of the liver after administration of CCL₄. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2021; 65(3): 48-55. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.03.48-55

Contribution: research concept and design – Bazarnyi V.V., Maklakova I.Yu., Tsvirenko S.V.; collection and processing of the material – Maklakova I.Yu., Grebnev D.Yu.; illustrative material – Bazarnyi V.V., Maklakova I.Yu.; statistical processing – Maklakova I.Yu., Grebnev D.Yu.; writing the text – Maklakova I.Yu., Tsvirenko S.V.; editing – Tsvirenko S.V., Grebnev D.Yu.

For correspondence: **Maklakova Irina Yurevna** (associate Professor of pathological physiology of the USMU is conducted by the Ministry of health of Russia, senior researcher «Institute of medical cell technologies», laboratory of anti-aging technology), e-mail: makliu@mail.ru

Financing. The study was carried out with the financial support of the state task "Development of a technology for using combined transplantation of multipotent mesenchymal stromal cells and stellate liver cells to activate liver regeneration in conditions of its damage", registration number 121032500021-1 dated 25.03.2021.

Conflict of interest. The authors declare that there is no conflict of interest. The materials of the article have not been published anywhere before.

Information about the authors:

Bazarnyi V.V., <https://orcid.org/0000-0003-0966-9571>

Grebnev D.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-5698-8404>

Received: 09.09.2020

Accepted: 30.06.2021

Published: 30.09.2021

Введение

Поиск путей активации регенеративных процессов в печени в условиях ее повреждения является актуальной проблемой. Одним из инструментов при этом может быть использование биомедицинских клеточных продуктов. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) 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 и иммуномодуляции печени [1, 2]. Учитывая их способность к выработке биологически активных веществ, а также их иммуномодулирующие характеристики, введение ММСК считается перспективным решением для терапии острой печеночной недостаточности [3-5]. В ранее проведенных исследованиях была показана возможность терапевтического воздействия трансплантации тимоцитов, ММСК на регенерацию печени [6]. Вместе с тем, в последние годы значительная роль в регенерации печени отводится звездчатым клеткам печени (ЗКП). Эти клетки формируют микроокружение для гепатоцитов, образуя коллаген IV, VI, XIV типов, гликопротеины, протеогликаны [7-9]. ЗКП способны вырабатывать митогены для гепатоцитов – HGF (Hepatocyte growth factor), SCF (stem cell factor) и др. [10, 11]. С другой стороны, ММСК также способны к выработке SCF, способствующего повышению пролиферативной активности ЗКП [1, 12]. Учитывая биологические особенности взаимодействия ММСК и ЗКП, представляется перспективным использовать сочетанную трансплантацию ММСК и ЗКП для активации регенерации печени в условиях ее токсического повреждения.

Цель исследования – изучение влияния сочетанной трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных и звездчатых клеток печени на морфофункциональное состояние печени после ее токсического повреждения, вызванного введением CCl_4 .

Методика

Эксперименты выполнены на 63 белых беспородных мышах-самцах возраст 7-8 мес, масса 25-27 г. Все эксперименты, уход и содержание животных осуществлялись в соответствии с Директивой № 63 от 22 сентября 2010 г. Президиума и Парламента Европы «О защите животных, используемых для научных исследований» и приказом Минздрава РФ № 267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики». Выполнение исследований одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Уральский госу-

дарственный медицинский университет» протокол № 8 от 20.10.2017.

Источником ММСК являлся хорион плаценты 5 лабораторных мышей-самок возраст 3–4 мес, срок гестации – 18 сут. Мононуклеарная фракция клеток была получена путем последовательной механической и ферментативной обработки (раствор аккутазы, Millipore, США) ткани плаценты. Выделение ЗКП осуществлялось методом коллагеназно-пропазовой перфузии печени с последующим разделением клеток в градиенте плотности гистоденза. Культивирование ММСК проводилось в условиях CO_2 – инкубатора (Termo Scientific, США) при температуре 37 °С с содержанием углекислого газа 5% и влажностью 90 %. Для трансплантации лабораторным животным были использованы ММСК третьего пассажа. Введение ЗКП проводилось сразу после выделения клеток.

Имунофенотипирование суспензии ММСК было проведено методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител, конъюгированных с флуорохромами (Becton Dickinson, США). В фракции трансплантируемых клеток оценивалось содержание ММСК с иммунофенотипом положительных по CD105 (Rat IgG_{2A} Anti-Mouse Endoglin/CD105-Fluorescein Clone 209701, RTU), CD29 (Rat IgG_{2A} Anti-Mouse Integrin beta 1/CD29-PE Clone 265917), Sca-1 (Rat IgG_{2A} Anti-Mouse Sca-1-APC Clone 177228) и отрицательных по CD45 (Rat IgG_{2B} Anti-Mouse CD45-PerCP Clone 30-F11) (Becton Dickinson, США) на проточном цитометре Beckman Coulter Navios с помощью набора Mouse Mesenchymal Stem Cell Multi-Color Flow Cytometry Kit (Bio-Techne, США). Количество жизнеспособных клеток с фенотипом CD45-CD105+Sca1+CD29+ составило 93,5 %. Для оценки функциональных свойств ММСК производилась их дифференцировка в адипоцитарном и остеогенном направлениях. Состав среды, индуцирующей дифференцировку в остеогенном направлении: MesenCult™ Osteogenic Stimulatory Supplement («StemCell Technologies», Канада). Состав среды, индуцирующей дифференцировку в адипоцитарном направлении: MesenCult™ Adipogenic Stimulatory Supplement («StemCell Technologies», Канада) и MesenCult™ MSC Basal Medium («StemCell Technologies», Канада) в соотношении 1:4, 2 ммоль раствора L-глутамин («StemCell Technologies», Канада). Факт остеогенной дифференцировки подтвержден гистохимическим методом регистрации увеличения экспрессии щелочной фосфатазы, а также с помощью окраски von Kossa, выявляющей наличие минерализованного фосфата кальция. Способ-

ность клеток дифференцироваться в адипоцитарном направлении подтверждена гистохимическим методом регистрации липидных вакуолей, окрашивающихся красителем Oil Red O. Идентификация ЗКП была проведена на проточном цитометре путем оценки эндогенной ретиноидной флуоресценции ЗКП. Жизнеспособность клеток перед трансплантацией была определена с использованием красителя 7-AAD (7-Aminoactinomycin D) и составила 95 – 97 %.

Были выделены следующие группы: опытная, контрольная и группа сравнения. У животных опытной и контрольной групп воспроизводили токсическое повреждение печени путем однократного внутрибрюшинного введения CCl_4 (50 мкл/мышь). Животным опытной группы в латеральную хвостовую вену вводились суспендированные в 0,2 мл 0,9% раствора NaCl ММСК и ЗКП в дозе 4 млн клеток/кг (120 тыс. клеток/мышь) и 9 млн клеток/кг (270 тыс. клеток/мышь) соответственно. Животным контрольной группы в латеральную хвостовую вену вводили 0,2 мл 0,9 % раствора NaCl. Группу сравнения составили лабораторные мыши без токсического повреждения печени, которым вводился 0,9 % раствор NaCl – 0,2 мл. В каждой группе было по 7 животных. Производилась оценка биохимических показателей сыворотки крови и морфометрических показателей печени на 1-е, 3-и, 7-е сут после введения клеток.

Для оценки морфометрических показателей печени изготавливали гистологические срезы печени толщиной 3-5 мкм, окрашивали гематоксилином-эозином. Для морфометрического анализа данных использовали компьютерную программу анализа изображений (Biovision, Россия). Производилась оценка следующих морфометрических показателей печени: количество гепатоцитов на 1 мм^2 , площадь гепатоцитов, площадь ядра гепатоцита, площадь цитоплазмы гепатоцита, ядерно-цитоплазматический индекс, количество двуядерных гепатоцитов на 1 мм^2 , митотический индекс. Для оценки апоптоза использовался набор первичных (Caspase-3 Antibody (L-18) goat polyclonal IgG, 1:100) (Santa Cruz Biotech, США), и вторичных антител (donkey anti-goat IgG-FITC, 1:100) (Santa Cruz Biotech, США) на гистологических срезах по идентификации эффекторной каспазы-3. Уровень запрограммированной гибели гепатоцитов оценивали путем подсчета апоптотического индекса:

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

Для проведения микроядерного теста путем механической и ферментативной обработки (проназа Е,

коллагеназа I тип и ДНК-аза (Sigma)) была получена суспензия клеток печени, из которой были изготовлены цитологические мазки. Окраска производилась 2,5% ацетоорсеином с докрасиванием цитоплазмы клеток 1% спиртовым раствором светлого зеленого [13].

С целью оценки выраженности репаративных процессов в клетках печени производился анализ количества Поли-АДФ-рибозаполимера, который является продуктом реакции Поли-АДФ-рибозилирования. Определение уровня данного показателя осуществлялось в клетках печени с использованием первичных (Anti-Poly (ADP-Ribose) Polymer antibody, abcam) и вторичных антител (Rabbit Anti-Chicken IgY H&L (FITC)) на проточном цитометре Beckman Coulter Navios по методу A. Kunzmann, D. Lui, K. Annett [14] на 7-е сут после моделирования токсического повреждения печени. Определялась средняя интенсивность флуоресценции популяции клеток (MFI), которая служит количественным критерием, характеризующим экспрессию антигенов (плотность рецепторов) внутри клеток.

Биохимические показатели сыворотки крови определяли кинетическими методиками с использованием анализатора Chem Well 2910 (Combi) и реагентов «Ольвекс Диагностикум», Россия. Изучались следующие биохимические показатели: содержание альбумина, активность аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), и щелочной фосфатазы (ЩФ).

Исходные данные имели нормальное распределение. Для проверки нормальности распределения показателей был использован критерий Шапиро-Уилка. Статистическая значимость различий в сравниваемых выборках определялась с применением t-критерия Стьюдента. Данные представлены в виде среднего арифметического значения (M) и стандартным отклонением (SD). Статистическая обработка данных проведена с помощью программного пакета SPSS Statistics (версия 17,0).

Результаты и обсуждение

Морфофункциональное состояние печени оценивали в динамике на 1-е, 3-и, 7-е сут на основании комплекса биохимических и морфологических параметров.

Через 24 ч после введения CCl_4 в печени развивались признаки острого токсического гепатита, которые проявлялись очаговыми некрозами гепатоцитов с лимфо-лейкоцитарной инфильтрацией. Отмечалась вакуольная дистрофия гепатоцитов, полнокровие сосудов, капилляростаз.

Через 24 ч после введения CCl_4 выявлены признаки активации запрограммированной клеточной гибели, а также увеличение количества цитогенетически измененных клеток (табл. 1). Эти изменения могут быть обусловлены метаболизмом CCl_4 , который подвергается действию митохондриальных оксидаз с последующим образованием свободных радикалов ($CCl_3\cdot$ и $Cl\cdot$). Это приводит к активации перекисного окисления липидов, и повреждению клеточных структур. В очаг повреждения мигрируют лейкоциты, которые синтезируют провоспалительные факторы. Повышение уровня провоспалительных цитокинов (TRAIL-TNF-related apoptosis-inducing ligand,

TNF- α) приводит к активации внешнего пути реализации апоптоза (через рецепторы клеточной гибели). Образующиеся свободные радикалы повреждают структуры ДНК, вследствие чего увеличивается количество патологических митозов и, как результат, повышается уровень цитогенетически измененных клеток.

Также на 1-е сут после введения CCl_4 отмечается повышение митотического индекса, увеличивается количество двуядерных гепатоцитов. Увеличение количества двуядерных гепатоцитов можно объяснить тем, что в ранние сроки репаративной регенерации значительная часть митозов является ацитокинетическими [7]. При сравнении опытной и контрольной групп мышей на 1-е сут после моделирования токсического повреждения печени статистически значимых различий не выявлено (табл. 1).

На 3-и и 7-е сут после введения CCl_4 у лабораторных животных, которым вводили ММСК и ЗКП обнаружено снижение признаков запрограммированной клеточной гибели, уменьшение количества цитогенетически измененных клеток, отмечается повышение митотической активности. Кроме этого, установлено повышение количества двуядерных клеток, увеличение площади ядер гепатоцитов, что привело к повышению ядерно-цитоплазматического индекса (табл. 2 и 3).

На 7-е сут после моделирования токсического повреждения печени, вызванного введением CCl_4 обнаружено статистически значимое повышение количества поли(АДФ-рибоза)-полимера в клетках печени (табл. 3).

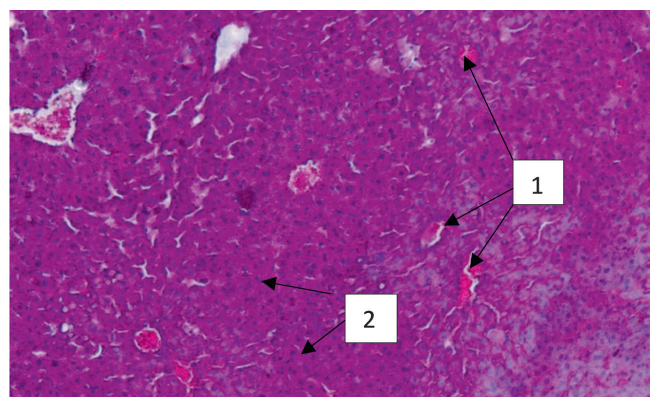


Рис. Ступенчатые некрозы гепатоцитов. 1 – полнокровие сосудов, 2 – некрозы гепатоцитов. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200.

Fig. Stepwise necroses of hepatocytes. 1 – vascular hyperemia, 2 – hepatocyte necrosis. Hematoxylin end eosin staining. Magnification: x 200.

Таблица 1/ Table 1

Морфометрические показатели печени на 1-е сут после введения CCl_4 , (M \pm SD, n=7)

Morphometric parameters of the liver on the first day after CCl_4 administration, (Mean \pm SD, n=7)

Показатели	Группы		
	NaCl (группа сравнения)	CCl_4 +NaCl (контрольная группа)	CCl_4 +ММСК+ЗКП (опытная группа)
Апоптотический индекс, ‰	0,41 \pm 0,06	4,87 \pm 0,39**	4,76 \pm 0,38*
Количество гепатоцитов с микроядрами, ‰	2,20 \pm 0,20	153,8 \pm 15,8*	142,3 \pm 14,9*
Митотический индекс, ‰	0,48 \pm 0,12	17,74 \pm 1,92*	18,33 \pm 1,46*
Количество двуядерных гепатоцитов на мм ²	233,43 \pm 14,6	530,43 \pm 52,94*	518,29 \pm 51,22*
Количество двуядерных гепатоцитов, %	14,9 \pm 1,40	25,74 \pm 2,38*	24,48 \pm 2,34*
Количество гепатоцитов на 1 мм ²	1567,57 \pm 113,20	2060,71 \pm 148,60*	2117,14 \pm 193,04*
Площадь гепатоцитов, мкм ²	264,90 \pm 15,80	186,43 \pm 13,52*	194,01 \pm 18,86*
Площадь ядра гепатоцитов, мкм ²	50,57 \pm 4,50	53,60 \pm 4,07	56,50 \pm 5,12
Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм ²	214,33 \pm 13,42	132,83 \pm 12,26*	137,51 \pm 12,93*
Ядерно-цитоплазматический индекс	0,24 \pm 0,03	0,41 \pm 0,04*	0,41 \pm 0,03*

Примечание. * p <0,05 – значимость различий с показателями группы сравнения.

Note. * p <0.05 – the significance of differences with the indicators of the comparison group.

При анализе биохимических показателей сыворотки крови, установлено, что на 1-е сут после введения CCl_4 отмечается повышение активности ферментов АСТ, АЛТ (синдром цитолиза) и, в результате сдавления экссудатом внутрипеченочных капилляров – ЩФ (синдром холестаза). Проведение в 1-е сут сочетанной трансплантации не привело к статистически значимым изменениям изучаемых показателей по сравнению с контрольной группой животных. На 3-и и 7-е сут отмечается снижение активности ферментов, ха-

рактеризующих цитолиз клеток – АСТ, АЛТ в опытной группе по сравнению с контрольной. На 7-е сут после моделирования токсического повреждения в группе животных с сочетанной трансплантацией ММСК и ЗКП помимо снижения активности АСТ, АЛТ выявлено восстановление содержания альбумина, снижение активности ЩФ по сравнению с контрольной группой (табл. 4).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что проведение сочетанной трансплан-

Таблица 2/Table 2

Морфометрические показатели печени на 3-и сут после введения CCl_4 , (M±SD, n = 7),**Morphometric parameters of the liver on the third day after CCl_4 administration, (Mean±SD, n=7)**

Показатели	Группы		
	NaCl (группа сравнения)	CCl_4 +NaCl (контрольная группа)	CCl_4 +ММСК+ЗКП (опытная группа)
Апоптотический индекс, ‰	0,43±0,04	3,70±0,39*	2,57±0,26***
Количество гепатоцитов с микроядрами, ‰	2,17±0,20	5,39±0,48*	3,81±0,33***
Митотический индекс, ‰	0,74±0,07	15,20±1,32*	20,47±1,86***
Количество двуядерных гепатоцитов на мм ²	234,43±12,84	474,43±49,28*	636,00±64,54***
Количество двуядерных гепатоцитов, %	15,37±1,49	24,93±2,34*	30,24±2,96*
Количество гепатоцитов на 1 мм ²	1525,57±128,31	1902,86±132,12*	2102,71±157,42*
Площадь гепатоцитов, мкм ²	267,54±10,81	205,03±20,27*	196,01±20,02*
Площадь ядра гепатоцитов, мкм ²	48,40±3,87	53,27±3,28	66,90±5,34***
Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм ²	219,14±10,22	151,76±17,98*	129,11±15,95*
Ядерно-цитоплазматический индекс	0,22±0,02	0,35±0,03*	0,52±0,05***

Примечание. * $p < 0,05$ – значимость различий с показателями группы сравнения; ** $p < 0,05$ – с показателями контрольной группы.

Note. * $p < 0.05$ – the significance of differences with the indicators of the comparison group; ** $p < 0.05$ – with the indicators of the control group.

Таблица 3/Table 3

Показатели морфофункционального состояния печени на 7-е сут после введения CCl_4 , (M±SD, n=7)**Morphometric parameters of the liver on the 7th day after CCl_4 administration. Morphometric parameters of the liver on the third day after CCl_4 administration, (Mean±SD, n=7)**

Показатели	Группы		
	NaCl (группа сравнения)	CCl_4 + NaCl (контрольная группа)	CCl_4 +ММСК+ЗКП (опытная группа)
Апоптотический индекс, ‰	0,39±0,04	3,74±0,35*	2,70±0,32***
Количество гепатоцитов с микроядрами, ‰	2,10±0,19	5,46±0,48*	4,01±0,36***
Митотический индекс, ‰	0,73±0,07	17,06±1,68*	21,43±2,08***
Активность ферментов семейства PARP в клетках печени, MFI	45,2±4,3	91,3±9,4*	133,5±12,8***
Количество двуядерных гепатоцитов на мм ²	237,29±11,63	388,57±32,52*	505,29±58,87***
Количество двуядерных гепатоцитов, %	15,42±1,56	19,71±1,82	28,13±2,66***
Количество гепатоцитов на 1 мм ²	1538,14±112,28	1970,71±144,51*	1796,14±138,71
Площадь гепатоцитов, мкм ²	264,67±9,67	204,71±17,83*	235,60±20,54*
Площадь ядра гепатоцитов, мкм ²	50,46±3,57	60,94±4,93*	83,51±7,76***
Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм ²	214,21±9,28	143,77±14,93*	158,73±14,26*
Ядерно-цитоплазматический индекс	0,24±0,02	0,43±0,04*	0,53±0,04***

Примечание. * $p < 0,05$ – значимость различий с показателями группы сравнения; ** $p < 0,05$ – с показателями контрольной группы.

Note. * $p < 0.05$ – the significance of differences with the indicators of the comparison group; ** $p < 0.05$ – with the indicators of the control group.

Таблица 4/ Table 4

Биохимические показатели крови лабораторных мышей, (M±SD, n = 7)

Blood biochemistry of laboratory mice, (mean±SD, n = 7)

Показатели		Группы		
		NaCl (группа сравнения)	NaCl (контрольная группа)	ММСК+ЗКП (опытная группа)
1 -е сутки	Альбумин, г/л	30,03±3,12	25,71±2,39	24,67±2,32
	АСТ, Ед/л	98,53±9,25	215,37±14,24 *	205,53±20,53*
	АЛТ, Ед/л	82,80±6,83	210,13±15,82 *	201,43±17,33*
	ЩФ, Ед/л	67,37±5,08	122,89±10,35*	116,34±11,93*
3 -и сутки	Альбумин, г/л	30,84±4,58	20,51±1,73*	22,39±2,29*
	АСТ, Ед/л	97,26±8,85	170,55±13,51*	126,08±11,84*.**
	АЛТ, Ед/л	81,13±8,93	166,46±12,24*	126,91±11,63*.**
	ЩФ, Ед/л	66,34±5,97	106,73±9,88*	93,28±9,83*
7-е сутки	Альбумин, г/л	31,41±3,57	22,74±2,02*	28,75±2,63**
	АСТ, Ед/л	104,56±9,95	138,45±10,53 *	99,46±7,15**
	АЛТ, Ед/л	89,23±6,34	154,50±11,17 *	115,03±10,76*.**
	ЩФ, Ед/л	63,30±5,24	91,20±8,37*	69,65±6,85**

Примечание. *p<0,05 – значимость различий с показателями группы сравнения; **p<0,05 – с показателями контрольной группы.

Note. *p<0.05 – the significance of differences with the indicators of the comparison group; **p<0.05-with the indicators of the control group.

тации ММСК и ЗКП способствует активации репаративной регенерации в печени при ее токсическом повреждении. Наблюдается активация клеточной регенерации за счет повышения митотической активности и ингибирования запрограммированной клеточной гибели.

Ферменты семейства PARP играют ключевую роль во многих фундаментальных биологических процессах, таких как репарация ДНК, регуляция клеточного цикла. Активация этих ферментов происходит в ответ на повреждение ДНК, вызванное эндогенными и экзогенными повреждающими агентами. Исправление повреждений в структуре ДНК приводит к снижению экспрессии проапоптогенных факторов, уменьшению количества цитогенетически измененных клеток, что можно расценивать как ингибирование повышенного уровня мутагенеза. Активация процессов репарации обеспечивает снижение запрограммированной клеточной гибели.

Восстановление уровня активности ферментов, являющихся маркерами цитолиза клеток, может быть связано с формированием межклеточных контактов между клетками печени и ММСК [5, 2]. Данный вид стволовых клеток способен индуцировать выработку белков теплового шока (шаперонов) в гепатоцитах

[15]. Шапероны обеспечивают стабилизацию цитоскелета, увеличивают устойчивость клеток к повреждению, денатурации структурных и функциональных белков клетки.

Заключение

Полученные данные свидетельствуют, что сочетанная трансплантация ММСК и ЗКП положительно влияет на морфофункциональное состояние печени в условиях ее токсического повреждения. Значимым механизмом можно считать влияние трансплантируемых ММСК и ЗКП на систему репарации клеток.

Литература

(п.п. 1-5; 9-12; 14; 15 см. References)

- Базарный В.В., Маклакова И.Ю., Гребнев Д.Ю., Юсупова В.Ч., Петрунина Е.М. К вопросу о клеточной регуляции регенерации печени. *Вестник Уральской медицинской академической науки.* 2019; 16(3): 357-64. <https://doi.org/10.22138/2500-0918-2019-16-3-357-364>
- Аруин Л.И., Бабаева А.Г., Гельфанд В.Б. и др. Структурные основы адаптации и компенсации нарушенных функций, под ред. Д.С. Саркисова. М.: Медицина; 1987.
- Шафигуллина А.К., Гумерова А.А., Трондин А.А., Титова М.А. Газизов И.М., Бурганова Г.Р. и др. Трансплантированные звездчатые клетки печени участвуют в регенерации органа после частичной гепатэктомии без риска развития фибро-

- за печени. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2012; VII (3).
13. Баглей Е.А., Недопитанская Н.Н., Лисовская В.С. Изучение генотоксичности ципроконазола в микроядерном тесте на гепатоцитах и эритроцитах костного мозга мышей. *Украинский журнал современных проблем токсикологии*. 2014; (1-2): 64-5.
- ### References
1. Brown Ch., McKee Ch., Bakshi Sh., Walker K., Govind C.K., Chaudhry G.R., et al. Mesenchymal Stem Cells: Cell Therapy and Regeneration Potential. *J Tissue Eng Regen Med*. 2019; 13(9): 1738-55. <https://doi.org/10.1002/term.2914>
 2. Hu C., Chenxia Hu, Lanjuan Li. Preconditioning influences mesenchymal stem cell properties in vitro and in vivo. *J Cellul Molec Med*. 2018; 22(3): 1428-42.
 3. Alfaif M. Mesenchymal stromal cell therapy for liver diseases / Mohammed Alfaifi, Young Woo Eom, Philip N., et al. *Journal of Hepatology*. 2018; Vol. 68: 1272-85.
 4. Christ B. The Therapeutic Promise of Mesenchymal Stem Cells for Liver Restoration / B. Christ, S. Brückner, S. Winkler // Trends in Molecular Medicine; 2016; 21(11): 673-686.
 5. Gilgenkrantz H. Understanding liver regeneration from mechanisms to regenerative medicine / H. Gilgenkrantz, A. C. de l'Hortet. *The American Journal of Pathology*. 2018; 188(6): 1316-27.
 6. Bazarnyj V.V., Maklakova I.Yu., Grebnev D.Yu., Yusupova V.Ch., Petrunina E.M. On the issue of cellular regulation of liver regeneration. *Vestnik Ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki*. 2019; 16(3): 357-64. (in Russian). DOI: 10.22138/2500-0918-2019-16-3-357-364
 7. Aruin L.I., Babaeva A.G., Gel'fand V.B., et al. *Structural bases of adaptation and compensation of impaired functions. [Strukturnye osnovy adaptatsii i kompensatsii narushennykh funktsiy]*. D.S. Sarkisov, ed. Moscow: Meditsina; 1987. (in Russian)
 8. Transplanted stellate liver cells participate in organ regeneration after partial hepatectomy without the risk of liver fibrosis / Shafigullina A.K., Gumerova A.A., Trondin A.A., Titova M.A. Gazizov I.M., Burganova G.R., Kaligin M.S., Andreeva D.I., Rizvanov A.A., Muhammedov A.R., Kiyasov A.P. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya*. 2012; VII (3). (in Russian)
 9. Gumerova A.A., Shafigullina A.K., Trondin A.A., Gazizov I.M., Andreeva D.I., Kaligin M.S., et al. Hepatic stellate cells stimulate hepatocyte differentiation of rat's bone marrow derived mesenchymal stem cells in vitro. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya*. 2011; 6(4): 72-81.
 10. Kordes C., Sawitza I., Gotze S., Herebian D. " aussinger, " Hepatic stellate cells contribute to progenitor cells and liver regeneration. *Journal of Clinical Investigation*. 2014; 124 (12): 5503-15.
 11. Yin C., Evason K.J., Asahina K., Stainier D.Y. Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer. *Journal of Clinical Investigation*. 2013; 123(5): 1902-10.
 12. Kobolak J., Dinnyes A., Memic A., et al. Mesenchymal Stem Cells: Identification, Phenotypic Characterization, Biological Properties and Potential for Regenerative Medicine Through Biomaterial Micro-Engineering of Their Niche. *Methods in Cell Science*. 2016; 99: 62-8.
 13. Bagley E.A., Nedopitanskaya N.N., Lisovskaya V.S. The study of cyproconazole genotoxicity in micronucleus test in hepatocytes and erythrocytes of mice bone marrow. *Ukrainskiy zhurnal sovremennykh problem toksikologii*. 2014; (1-2): 64-5. (in Russian)
 14. Flow-cytometric assessment of cellular poly(ADP-ribosyl)ation capacity in peripheral blood lymphocytes / A. Kunzmann, D. Lui, K. Annett [et al.] *Immunity & Ageing*. 2006; 3:8. doi:10.1186/1742-4933-3-8
 15. Fitter S., Gronthos S., Ooi S.S., Zannettino A.C.W. The mesenchymal precursor cell marker antibody STRO-1 binds to cell surface heat shock cognate 70. *Stem Cells*. 2017; 35(4): 940-51.

Сведения об авторах:

Маклакова Ирина Юрьевна, канд. мед. наук, доцент каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России; ст. науч. сотр. ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий, e-mail: makliu@mail.ru;

Цвиренко Сергей Васильевич, доктор мед. наук, зав. каф. клин. лаб. диагностики и бактериологии ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, e-mail: tsvirenkos@bk.ru;

Базарный Владимир Викторович, доктор мед. наук, проф. каф. клин. лаб. диагностики и бактериологии ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, e-mail: bazarnyy_v@bk.ru;

Гребнев Дмитрий Юрьевич, доктор мед. наук, зав. каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, e-mail: dr-grebnev77@mail.ru