

УДК 616.36-003.93:576.54

*В.В. Базарный¹, И.Ю. Маклакова^{1,2}, Д.Ю. Гребнев^{1,2},
В.Ч. Юсупова¹, Е.М. Петрунина³*

К ВОПРОСУ О КЛЕТОЧНОЙ РЕГУЛЯЦИИ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ

¹ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет Минздрава России,
г. Екатеринбург, Российская Федерация;

²ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, г. Екатеринбург, Российская Федерация;

³Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии – филиал ФГБУ «НМИЦ ФПИ»,
г. Екатеринбург, Российская Федерация

*V.V. Bazarniy¹, I.Yu. Maklakova^{1,2}, D.Yu. Grebnev^{1,2},
V.Ch. Yusupova¹, E.M. Petrunina³*

ABOUT CELLULAR REGULATION OF LIVER REGENERATION

¹Ural State Medical University. Ministry of Health of Russia, Ekaterinburg, Russian Federation;

²Institute of Medical Cell Technologies, Ekaterinburg, Russian Federation;

³Ural Research Institute of Phthisiopulmonology, Ekaterinburg, Russian Federation

Резюме. Цель работы — оценка использования клеточных технологий для активации регенерации печени в физиологических условиях и в условиях ее повреждения.

Материалы и методы. Использованы различные экспериментальные модели, заключающиеся в трансплантации интактным животным и животным после частичной гепатэктомии тимических клеток или мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК). Регенерацию печени оценивали по морфологическим и биохимическим показателям. ММСК были выделены из хориона плаценты 10 лабораторных животных мышей-самок возраста 3–4 месяца, массой 22–25 г, срок гестации 14 дней. Культивирование ММСК проводилось в условиях CO₂-инкубатора при температуре 37°C с содержанием углекислого газа 5% и влажностью 90%. Для трансплантации лабораторным животным были использованы ММСК третьего пассажа в дозе 4 млн. клеток/кг. **Результаты.** Трансплантация тимических клеток доноров после частичной резекции печени интактным реципиентам вызывала увеличение числа двуядерных гепатоцитов и содержания ДНК в них. Дефицит железа приводил к снижению этой способности Т-лимфоцитов. Трансплантация ММСК лабораторным животным после гепатэктомии привела к повышению митотического индекса, увеличению количества двуядерных гепатоцитов, а также к повышению площади ядра гепатоцитов, что привело к возрастанию ядерно-цитоплазматического индекса. Также на фоне введения ММСК у крыс с резекцией печени отмечено снижение активности ферментов, характеризующих цитолиз клеток. **Заключение.** Установлено, что лимфоидные клетки и ММСК способны стимулировать репаративные процессы в печени. Обнаружено усиление клеточной регенерации (повышение митотической активности) и внутриклеточной (увеличение

Abstract. The aim of the work is to assess the possible use of cell technology activating liver regeneration from physiological conditions and after injury.

Materials and methods. Various experimental models were used for transplantation of thymic cells or multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) to intact animals and animals after a partial hepatectomy. Liver regeneration was evaluated by morphological and biochemical parameters. MSCs were isolated from placenta chorion of 10 laboratory female mice aged 3–4 months, weighing 22–25 g, gestation period of 14 days. MSCs were grown in a standard cell culture incubator conditions — 37°C, 5% CO₂, with carbon dioxide content of 5% and humidity of 90%. For transplantation to laboratory animals MSCs of passage 3 at a dose of 4 million cells/kg were used.

Results. Transplantation of donor thymic cells after partial liver resection to intact recipients caused an increase in the number of binuclear hepatocytes and in DNA content in these hepatocytes. Iron deficiency led to a decrease in this ability of T-lymphocytes.

Transplantation of MSCs to laboratory animals after hepatectomy led to an increase in the mitotic index, the number of binuclear hepatocytes, and the hepatocyte nuclear area. All these factors led to an increase of the nuclear-cytoplasmic ratio. After infusion of MSCs to rats with liver resection, the activity of the cytotoxic enzymes that induce cell death decreased.

Conclusion. The study revealed that lymphoid cells and MSCs are able to stimulate reparative processes in the liver. Increased cellular (mitotic activity) and intracellular (greater number of binuclear hepatocytes) regeneration were revealed, normalization of biochemical parameters after liver resection were discovered.

количества двуядерных гепатоцитов), нормализация биохимических показателей после резекции печени.

Ключевые слова: регенерация печени, лимфоциты, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки

Конфликт интересов отсутствует.

Контактная информация автора, ответственного за переписку:

Маклакова Ирина Юрьевна

makliu@mail.ru

Дата поступления 21.03.2019 г.

Образец цитирования:

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, Том 16, №3, с. 357-364, DOI: 10.22138/2500-0918-2019-16-3-357-364

Keywords: liver regeneration, lymphocytes, multipotent mesenchymal stromal cells

There is no conflict of interest.

Contact details of the corresponding author:

Maklakova Irina Yuryevna

makliu@mail.ru

Received 21.03.2019

For citation:

Bazarniy V.V., Maklakova I.Yu., Grebnev D.Yu., Yusupova V.Ch., Petrunina E.M. About Cellular Regulation of Liver Regeneration. Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki. = Journal of Ural Medical Academic Science. 2019, Vol. 16, no. 3, pp. 357-364. DOI: 10.22138/2500-0918-2019-16-3-357-364 (In Russ)

Одним из направлений научных исследований проф. А.П. Ястребова была лимфоидная регуляция репаративного потенциала ткани. Оно базировалось на открытой ранее у иммунокомпетентных клеток, прежде всего — Т-лимфоцитов, морфогенетической функции [1]. Она заключается в способности лимфоидных клеток «транспортировать» регенераторную информацию в условиях адоптивного переноса. Внимание А.П. Ястребова и его учеников было сосредоточено на различных аспектах участия тимических клеток в регенерации тканей [2, 3]. Ранее были получены данные о способности Т-лимфоцитов транспортировать «регенераторный стимул». Эта особенность Т-лимфоцитов также была обнаружена и при повреждении печени [1]. В тоже время ранее было установлено, что «железодефицитные» тимические клетки утрачивают «эритропоэтическую» активность, но способность к реализации морфогенетической функции при патологии печени требует уточнения. В последние годы под руководством А.П. Ястребова проводились исследования по изучению возможности использования различных видов стволовых клеток для активации регенерации тканей в условиях их повреждения. Одним из видов таких клеток являются мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК). ММСК обладают способностью синтезировать фактор роста стволовой клетки, который через увеличение количества звездчатых клеток печени Ито обеспечивает увеличение количества гепатоцитов, вырабатывать противовоспалительные цитокины (ИЛ-10, трансформирующий фактор роста — β) [4, 5]. Принимая во внимания биологические свойства ММСК, представляется перспективным изучение возможностей активации регенерации печени после ее повреждения с использованием данного вида клеток.

Настоящее исследование посвящено юбилею нашего Учителя — профессора А.П. Ястребова и является продолжением его идей. **Целью данной работы** является оценка использования клеточных технологий для активации регенерации печени в физиологических условиях и в условиях ее повреждения.

One of the areas of scientific interest and research work conducted by Prof. A.P. Yastrebov was lymphoid regulation of tissue reparative potential. It was based on the morphogenetic function, which was earlier discovered in immunocompetent cells, primarily T-lymphocytes [1]. It lies in the ability of lymphoid cells to transfer the regeneration information in conditions of adoptive cell transfer. The attention of A.P. Yastrebov and his students was focused on various aspects of thymic cell involvement in tissue regeneration [2, 3]. Previously, data were obtained on the ability of T-lymphocytes to transfer “regenerative stimulus”. This peculiarity of T-lymphocytes was also detected in cases of liver injury [1]. At the same time, it was previously established that “iron deficient” thymic cells lose their “erythropoietic” activity. However, their ability to realize morphogenetic function in cases of liver pathology requires additional study. In recent years, Prof. A.P. Yastrebov headed extensive research works related to the possible use of different types of stem cells for activation of tissue regeneration after injury or insult. One type of such cells was multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs). MSCs have an ability to synthesize stem cell growth factor, which, through an increase in the number of hepatic stellate cells (Ito cells), provides an increase in the number of hepatocytes. Besides, MSCs produce anti-inflammatory cytokines (IL-10, transforming growth factor β) [4, 5]. Taking into account the MSCs’ biological properties, studying the possible use of this type of cells for activating the injured liver regeneration seems to be very promising.

This paper is dedicated to the jubilee of our Teacher — Professor A.P. Yastrebov and is a continuation of his ideas. The aim of this work is to assess the use of cell technology for activation of liver regeneration under physiological conditions and after injury.

Materials and methods

The effect of thymic cell and MSC administration on liver regeneration of intact and hepatectomized recipients was evaluated. Laboratory animals were kept in standard vivarium conditions and all manipulations were

Материалы и методы

В работе оценили влияние введения тимических клеток и ММСК на регенерацию печени интактных и гепатэктомированных реципиентов. Лабораторных животных содержали в стандартных условиях вивария и все манипуляции проводили в соответствии с Директивой №63 от 22 сентября 2010 года 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 государственный медицинский университет» протокол №8 от 20.10.2017. Резекция 70% печени выполнена по методике С. Mitchell, H. Willenbring [6] в условиях ингаляционного наркоза фораном. Из опыта животных выводили декапитацией под легким эфирным наркозом.

В первой серии экспериментов изучали влияние тимоцитов на регенерацию печени при железодефицитной анемии (ЖДА). Эксперимент выполнен на 48 крысах-самцах линии Вистар (питомник «Рапполово» РАН) массой 180-200 г. Дизайн данного эксперимента заключался в том, что интактным крысам вводили тимоциты от сингенных доноров, которые были представлены интактными животными, крысами после частичной гепатэктомии (ЧГЭ), животными с ЖДА после ЧГЭ. Тимоциты выделяли пропусканием через капроновый фильтр механически измельченного тимуса.

ЖДА моделировали путем повторных кровопусканий, введения железосвязывающего комплекса десферал и содержанием животных на обедненной железом диете.

Трансплантацию донорских клеток реципиентов осуществляли в асептических условиях в каудальную вену в количестве 100×10^6 лимфоцитов на 100 г массы животного

Вторую серию экспериментов выполнили на 42 белых лабораторных мышах-самцах возраста 7-8 месяцев, массой 25-30 г. Эксперименты по получению культуры ММСК выполнены из хориона зрелой плаценты 10 лабораторных животных мышей-самок возраста 3-4 месяца, массой 22-25 г.

Культивирование ММСК проводилось в условиях CO₂-инкубатора (Termo Scientific, США) при температуре 37°C с содержанием углекислого газа 5% и влажностью 90%. Для трансплантации лабораторным животным были использованы ММСК третьего пассажа. Идентификация ММСК проводилась иммуноцитохимическим методом с использованием набора Mesenchymal Stem Cell Characterization Kit (Millipore, США), содержащего позитивные (антитела к integrin $\beta 1$, CD 54, collagen type I и fibronectin) и негативные маркеры (антитела к CD 14, CD 45). Жизнеспособность клеток была определена с помощью суправитальной окраски раствором трипанового синего и перед трансплантацией составила 95-97%.

carried out in accordance with European Parliament and Council Directive No.63 of September 22, 2010 “On the Protection of Animals used for Scientific Research” and Order No.267 issued on 19/06/2003 by the Ministry of Health of the Russian Federation “On the Approval of Laboratory Practice Rules”. The studies were approved by the local Ethics Committee of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education “Ural State Medical University”, Protocol No.8 dated 20/10/2017. A 70% partial hepatectomy was performed under inhalation anesthesia according to the technique described by Mitchell C and Willenbring H [6]. The animals were euthanized by decapitation under light ether anesthesia.

In the first series of experiments, the effect of thymocytes on liver regeneration in animals with iron deficiency anemia (IDA) was studied. The experiment was performed on 48 male Wistar rats (Rappolovo Breeding Center, the Russian Academy of Sciences) weighing 180-200 g. The design of this experiment involved infusion of thymocytes in intact rats. Thymocytes were obtained from syngeneic donors, which were intact animals, rats after partial hepatectomy (PH), and animals with IDA after PH. Thymocytes were isolated from thymic tissues, which were mechanically dispersed and sieved through nylon mesh.

IDA was induced by repeated phlebotomies, administration of an iron-binding complex deferoxamine (desferal) and keeping animals on an iron-poor diet.

Donor cells were transplanted to the recipient in aseptic conditions. The cells were infused into the caudal vein (100×10^6 lymphocytes per 100 g of animal weight).

The second series of experiments was performed on 42 white laboratory male mice aged 7-8 months, weighing 25-30 g. The MSC culture was obtained from mature placenta chorion of 10 female mice 3-4 months old, weighing 22-25 g.

MSCs were grown in a standard cell culture incubator conditions — 37°C, 5% CO₂, with carbon dioxide content of 5% and humidity of 90% (TermoScientific incubator, USA). For transplantation in laboratory animals, the third passage of MSCs was used. MSCs were identified by the immunocytochemistry using the Mesenchymal Stem Cell Characterization Kit (Millipore, USA) containing positive (antibodies to integrin $\beta 1$, CD 54, collagen type I and fibronectin) and negative markers (antibodies to CD 14, CD 45). Cell viability was determined by trypan blue staining and before transplantation it was 95-97%.

The effect of MSCs on the morphometric parameters of liver and biochemical parameters of peripheral blood was studied under physiological conditions and after the liver resection on days 1, 3, 7 after cell transplantation. The choice of these dates was due to the fact that by the 10th day the liver restores its mass. The animals were divided into two groups: experimental and control. The animals of the experimental group were intravenously administered a suspension of MSCs at a dose of 4 million cells/kg. The control rats received injections of 0.2 ml 0.9% NaCl

Исследовалось влияние ММСК на морфометрические показатели печени и биохимические показатели периферической крови в физиологических условиях и после резекции печени на 1, 3, 7 сутки после трансплантации клеток. Выбор данных сроков был обусловлен тем, что к 10 суткам происходит восстановление массы печени. Были выделены опытная и контрольная группы. Животным опытной группы внутривенно вводилась суспензия ММСК в дозе 4 млн кл/кг, контрольной группе вводили 0,9% раствор NaCl – 0,2 мл. Трансплантация клеток осуществлялась в воротную вену сразу же после резекции печени однократно.

Оценку восстановительных процессов в печени проводили на основании морфологических и биохимических исследований.

Подготовку образцов ткани печени для гистологического исследования осуществляли на автоматическом процессоре Termo Scientific (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). 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 двухядерных гепатоцитов на мм², 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.

В одной из серий эксперимента также оценивали содержание ДНК в гепатоцитах цитофлуориметрическим методом по Хачатурову. Для этого мазки-отпечатки печени фиксировали в смеси спирта и уксусной кислоты, проводили гидролиз ДНК 0,1N раствора соляной кислоты с последующей окраской этакридина лактатом. Затем оценивали плотность окрашивания ядер с помощью люминесцентного микроскопа МЛ-3 с люминесцентно-фотометрической насадкой ФМЭЛ-1А. Результат выражали в условных единицах интенсивности люминесценции на один гепатоцит.

Биохимические показатели включали определение в сыворотке крови общего белка биуретовым методом, альбумина (колориметрический метод с бромкрезоловым зеленым), мочевины (уреазо-салицилат-гипохлоритный метод, реакция Бертлота), глюкозы глюкозооксидазным методом, общего билирубина (Метод Йендрашека-Грофа), и активности ферментов аспаратаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), щелочной фосфатазы (ЩФ) унифицированными кинетическими методами на автоматическом биохимическом и иммуноферментном анализаторе Chem Well 2910 (Combi).

solution. The cell transplantation was performed via the portal vein in the form of a single injection immediately after liver resection.

The healing process of the traumatic liver lesion was assessed on the basis of morphological studies and biochemical analysis.

The liver tissue samples for histological examination were prepared using TermoScientific detection system (Germany), followed by embedding these specimens in paraffin. The specimens were sectioned at a thickness of 2–3 μm and the sections were stained with hematoxylin-eosin. For morphometric data analysis, a computer image processing program (Biovision, Russia) was used. In addition to the total the number of hepatocytes per 1 mm², the following morphometric indices of the liver were measured for each hepatocyte: the total cellular area, nuclear area, cytoplasm area = hepatocyte surface area – hepatocyte nuclear area, the nuclear-cytoplasmic ratio (NCR), number of binuclear hepatocytes per mm², the mitotic index (MI). The nuclear-cytoplasmic ratio (NRC) was determined as a ratio of the size of the cell nucleus to the size of its cytoplasm. The mitotic index was expressed in permille (‰), i.e. the number of mitoses per 1000 cells.

In one of the experimental series, the DNA content of hepatocytes was investigated, by means of cytofluorimetric method developed by Khachaturov. Liver imprint smears were fixed in an ethanol-acetic acid mixture. DNA was hydrolyzed with 0.1N hydrochloric acid solution, followed by staining with ethacridine lactate. Then, the nuclear staining density was measured using a ML-3 luminescent microscope with a FMEL-1A luminescent-photometric nozzle. The result was expressed in arbitrary units of luminescence intensity per hepatocyte.

The studied biochemical parameters included the following measurements: total protein in blood serum (biuret reaction), albumin assay (bromocresol green method), urea (urease-salicylate-hypochlorite method, Bertlot reaction), glucose (glucose oxidase method), total bilirubin (Jendrassik-Grof method), and the tests for aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), which were performed by unified kinetic methods using ChemWell 2910 (Combi), an automated biochemical and enzyme immunoassay analyzer.

Taking into account that the statistical dispersion was close to normal and the value variations did not exceed 30%, parametric criteria were used for statistical analysis. The significance of differences between the groups was evaluated by Student's t-test.

Results

In the first experimental series, transplantation of “intact” thymic cells did not cause any changes in the activity of intracellular regeneration in the livers of intact recipients (see Table 1).

Under the influence of thymocytes obtained from donors with partial hepatectomy, evident signs of stimulation of

Учитывая, что распределение величин в вариационном ряду приближалось к нормальному и вариация не превышала 30%, при статистическом анализе использовали параметрические критерии. Достоверность различий между группами оценивали с помощью критерия Стьюдента.

Результаты

В первой серии экспериментов трансплантация «интактных» тимических клеток не вызывала изменения активности процессов внутриклеточной регенерации в печени у интактных реципиентов (таблица 1).

Таблица 1

Показатели активности восстановительных процессов в печени у реципиентов тимоцитов

Группы доноров	Показатели реципиентов	
	ДНК усл.ед./клетка	Двухядерные клетки,%
Интактные животные (контроль)	32,7±3,6	2,0±0,4
Животные после ЧГЭ	43,1±4,2*	14,0±0,8*
Животные после ЧГЭ + ЖДА	34,3±2,5	5,1±0,6*

Примечание. В таблицах 1 и 2: * — $p < 0,05$ в сравнении с контролем.

Под влиянием тимоцитов от доноров с ЧГЭ отчетливо видны признаки стимуляции регенерации печени. Это проявляется увеличением числа двухядерных клеток, что сопровождается усилением в них синтетических процессов — содержание ДНК в ядре возросло на 31%.

У «железодефицитных» реципиентов морфогенетическая функция была снижена: число двухядерных гепатоцитов имело тенденцию к повышению, но заметного возрастания уровня ДНК не отмечалось.

Дальнейшим этапом работы было изучение влияния трансплантации ММСК на регенерацию печени после ее резекции. На 1 и 3 сутки после введения ММСК лабораторным животным с резекцией печени не обнаружено достоверных изменений изучаемых показателей по сравнению с группой контроля. При анализе биохимических показателей периферической крови на 7 сутки после резекции печени на фоне введения ММСК отмечено снижение уровня показателей цитолиза гепатоцитов. Так, выявлено снижение активности АСТ на 23,8%, ($p < 0,05$), АЛТ на 26,2%, ($p < 0,05$), щелочной фосфатазы на 20,8%, ($p < 0,05$). При этом, сравнивая изучаемые показатели с данными интактных животных, следует отметить, что отмечено восстановление АСТ, АЛТ, щелочной фосфатазы до значений контроля. Также отмечена нормализация уровня мочевины до значений интактных животных (таблица 2).

При анализе морфометрических показателей лабораторных мышей на 7 сутки после резекции печени в опытной группе отмечено увеличение митотического индекса на 27,7%, увеличение количества двухядерных

liver regeneration are clearly visible. This is manifested by an increase in the number of binuclear cells, which is accompanied by an increase in their synthesis – the DNA content in the nucleus increased by 31%.

Table 1

Parameters of Regenerative Process Activity in the Livers of Thymocyte Recipients

Group of Donors	Recipient Parameter	
	DNA arbitrary unit / cell	Binuclear Cells,%
Intact animals (control group)	32.7±3.6	2.0±0.4
Animals after partial hepatectomy	43.1±4.2*	14.0±0.8*
Animals after partial hepatectomy + iron-deficiency anemia	34.3±2.5	5.1±0.6*

Note. In Tables 1 and 2: * — $p < 0.05$ compared with the control group.

In “iron deficient” recipients, the morphogenetic function was reduced: the number of binuclear hepatocytes tended to increase, but there was no noticeable increase in the DNA content.

The next stage of the work was to study the effect of MSC transplantation on liver regeneration after resection. On days 1 and 3 after administration of MSCs to laboratory animals with liver resection, no significant changes in the studied parameters were found in comparison with the control group. On the 7th day after liver resection, the analysis of peripheral blood biochemical parameters in MSC-injected rodents showed reduction of hepatocyte cytolysis: for example, AST activity decreased by 23.8%, ($p < 0.05$), ALT by 26.2%, ($p < 0.05$), alkaline phosphatase by 20.8%, ($p < 0.05$). At the same time, comparison of the studied parameters with the data of intact animals revealed that AST, ALT and ALP parameters returned to control values. Normalization of the urea level to the values of intact animals was also noted (Table 2).

Table 2

Blood Biochemical Parameters of Laboratory Mice on the 7th Day after Liver Resection

Parameters	Groups of Animals	
	NaCl	MSC
Total protein, g/l	52.87±3.34	54.06±4.73
Albumin, g/l	24.47±2.60	25.19±3.73
Urea, mmol/l	4.57±0.46	5.57±0.48 *
Glucose, mmol/l	4.79±0.38	4.91±0.51
Total bilirubin, μ mol/l	15.41±2.76	14.81±2.02
AST, U/l	135.97±9.92	103.57±12.42 *
ALT, U/l	117.04±11.34	86.34±7.52 *
Alkaline Phosphatase, U/l	83.11±5.93	64.23±6.00 *

Note: * $P < 0.05$ — the difference is statistically significant compared with the control group

клеток на 22,8%. Также отмечено увеличение площади ядра гепатоцитов на 20,9%, что привело к возрастанию ЯЦИ на 31,0% (таблица 3).

Таблица 2

Биохимические показатели крови лабораторных мышей на 7 сутки после резекции печени

Показатели	Группы животных	
	NaCl	ММСК/ММСС
Общий белок, г/л	52,87±3,34	54,06±4,73
Альбумин, г/л	24,47±2,60	25,19±3,73
Мочевина, ммоль/л	4,57±0,46	5,57±0,48 *
Глюкоза, ммоль/л	4,79±0,38	4,91±0,51
Общий билирубин, мкмоль/л	15,41±2,76	14,81±2,02
АСТ, Ед/л	135,97±9,92	103,57±12,42 *
АЛТ, Ед/л	117,04±11,34	86,34±7,52 *
Щелочная фосфатаза, Ед/л	83,11±5,93	64,23±6,00 *

Примечание: * — отличие от контрольной подгруппы животных, достоверно с $p < 0,05$.

Таблица 3

Морфометрические показатели печени лабораторных мышей на 7 сутки после резекции печени

Показатели	Группы животных	
	NaCl	ММСК/ММСС
Количество гепатоцитов на 1 мм ²	1918,29±82,04*	1881,86±75,55*
Площадь гепатоцитов, мкм ²	286,41±22,44	275,14±24,16
Площадь ядра гепатоцитов, мкм ²	63,39±5,12*	76,63±4,92* **
Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм ²	223,03±17,97	204,37±22,80
Ядерно-цитоплазматическое отношение	0,29±0,02*	0,38±0,02* **
Количество двуядерных гепатоцитов на мм ²	320,77±10,64*	393,90±23,23* **
Митотический индекс/	4,51±0,47*	5,76±0,49* **

Примечание:

* — отличие от интактной подгруппы лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$;

** — отличие от контрольной подгруппы лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

Результаты второго этапа исследования свидетельствуют о способности ММСК обеспечивать восстановление биохимических и морфологических показателей работы печени.

Заключение

В результате исследования установлено, что лимфоидные клетки и ММСК способны стимулировать процессы регенерации в печени. Нарушение метаболических процессов в трансплантируемых клетках (например, тимоцитов при ЖДА), снижает эту способность. При этом выявлены механизмы, через которые реализуется восстановление изучаемых показателей печени. Обнаружено усиление клеточной регенерации (по-

The analysis of the morphometric parameters of laboratory mice on the 7th day after liver resection in the experimental group showed an increase in the mitotic index by 27.7%, and in the number of binuclear cells by 22.8%. An increase in the hepatocyte nuclear area by 20.9% was also noted, which led to an increase of the nuclear-cytoplasmic ratio by 31.0% (see Table 3).

Table 3

Liver Morphometric Parameters of the Liver Cells of Laboratory Mice on the 7th Day After Liver Resection

Parameter	Groups of Animals	
	NaCl	MSC
Number of hepatocytes per 1 mm ²	1918.29±82.04*	1881.86±75.55*
Hepatocyte surface area, μm ²	286.41±22.44	275.14±24.16
Hepatocyte nuclear area, μm ²	63.39±5.12*	76.63±4.92* **
Cytoplasmic area of hepatocytes, μm ²	223.03±17.97	204.37±22.80
Nuclear-cytoplasmic ratio	0.29±0.02*	0.38±0.02* **
Number of binuclear hepatocytes per mm ²	320.77±10.64*	393.90±23.23* **
Mitotic index	4.51±0.47*	5.76±0.49* **

Note: * $P < 0.05$ — the difference is statistically significant compared with the intact group

** $P < 0.05$ — the difference is statistically significant compared with the control group.

The results of the second experimental stage indicated the ability of MSCs to stimulate restoration of the biochemical and morphological liver parameters.

Conclusion

The study revealed that lymphoid cells and MSCs are able to stimulate regeneration processes in the liver. Any abnormal chemical reactions that alter the normal metabolic processes in transplanted cells (for example, thymocytes in case of IDA) reduces this ability. The mechanisms of restoration of the liver parameters were studied. An increase in cellular (mitotic activity) and intracellular (greater number of binuclear hepatocytes) regeneration was found. The biochemical study showed reduction in the parameters of hepatocyte cytolysis and synthetic activity of hepatocytes. Analyzing the obtained data, it can be assumed that lymphoid and mesenchymal cells have the ability to affect the regeneration processes in the liver through both intercellular cooperation and through the production of cytokines. In particular, T-lymphocytes produce IL-6, IL-17, IL-22 and others, which have pleiotropic effects, including stimulation of synthetic processes in hepatocytes [7, 8, 9].

Studies have proved a possibility to stimulate liver regeneration using cell technology both under physiological conditions and after liver resection.

вышение митотической активности) и внутриклеточной (увеличение количества двуядерных гепатоцитов). По данным биохимического исследования выявлено уменьшение показателей цитолиза гепатоцитов и их синтетической активности. Анализируя полученные данные, можно полагать, что лимфоидные и мезенхимальные клетки обладают способностью воздействовать на процессы регенерации в печени как через межклеточную кооперацию, так и через продукцию цитокинов. В частности, Т-лимфоциты продуцируют ИЛ-6, ИЛ-17, ИЛ-22 и другие, обладающие плеiotропными эффектами, в числе которых — стимуляция синтетических процессов в гепатоцитах [7, 8, 9].

Проведенные исследования свидетельствуют о возможности стимуляции регенерации печени с использованием клеточных технологий как в физиологических условиях, так и после резекции печени.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабаева А.Г. Регенерация: факты и перспективы. М.: Издательство РАМН, 2009. - 336 с.
2. Базарный В.В., Ястребов А.П., Мещанинов В.Н. Экспериментальное обоснование иммуноцитотерапии нарушений кроветворения. Вестник Уральской медицинской академической науки. 2006. № 2. С. 7-8.
3. Сазонов С.В. Т-лимфоциты регуляторы активности пролиферации клеток в ткани (научный обзор). Вестник Уральской медицинской академической науки. 2007. № 1. С. 91-94.
4. Ястребов А.П., Маклакова И.Ю., Гребнев Д.Ю., Осипенко А.В., Вечкаева И.В., Сырнев В.А., и др. Об участии стволовых клеток в регуляции регенераторных механизмов при экстремальных повреждениях. Вестник Уральской медицинской академической науки. 2016. № 1 (56). С. 70-73.
5. Ястребов А.П., Гребнев Д.Ю., Маклакова И.Ю. Стволовые клетки, их свойства, источники получения и роль в регенеративной медицине. Екатеринбург: УГМУ. 2016.
6. Mitchell C., Willenbring H. A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice // Nature protocols. Vol.3. №7.2008. P. 1167-1171. doi: 10.1038/nprot.2014.122.
7. Li N., Hua J. Immune cells in liver regeneration. *Oncotarget*. 2017 Jan 10; 8(2): 3628–3639. doi: 10.18632/oncotarget.12275
8. Li H, Shen S, Fu H, Wang Z, Li X, Sui X, Yuan M, Liu S, Wang G, Guo Q. Immunomodulatory Functions of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Engineering. *Stem Cells Int*. 2019 :9671206. doi: 10.1155/2019/9671206.
9. Piotto C, Julier Z, Martino MM. Immune Regulation of Tissue Repair and Regeneration via miRNAs-New Therapeutic Target. *Front Bioeng Biotechnol*. 2018 Jul 13;6:98. doi: 10.3389/fbioe.2018.00098.

REFERENCES

1. Babaeva A.G. Regeneration and system of immunogenesis. M.: Medicina, 1985. (in Russian)
2. Bazarniy V.V., Yastrebov A.P., Meshchaninov V.N.. Experimental study of immunocytotherapy of dyshematopoiesis. *Vestnik Ural'skoj medicinskoj akademicheskoy nauki*. 2006.# 2.P. 7-8. (in Russian)
3. Sazonov S.V. T-lymphocytes as regulators of cell proliferation activity in tissue (scientific review). *Vestnik Ural'skoj medicinskoj akademicheskoy nauki*. 2007. # 1.P. 91-94. (in Russian)
4. Yastrebov A.P., Maklakova I.Yu., Grebnev D.Yu., Osipenko A.V., Vechkaeva I.V., Syrnev V.A. et.al. On the participation of stem cells in the regulation of regenerative mechanisms in extreme injuries. *Vestnik Ural'skoj medicinskoj akademicheskoy nauki*. 2016. # 1 (56). P. 70-73. (in Russian)
5. Yastrebov A.P., Grebnev D.Yu., Maklakova I.Yu. Stem cells, their properties, sources of production and role in regenerative medicine. *Ekaterinburg: USMU*. 2016. (in Russian)
6. Mitchell C., Willenbring H. A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice // *Nature protocols*. Vol.3. #7.2008. P. 1167-1171. doi: 10.1038/nprot.2014.122
7. Li N., Hua J. Immune cells in liver regeneration. *Oncotarget*. 2017 Jan 10; 8(2): 3628–3639. doi: 10.18632/oncotarget.12275
8. Li H, Shen S, Fu H, Wang Z, Li X, Sui X, Yuan M, Liu S, Wang G, Guo Q. Immunomodulatory Functions of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Engineering. *Stem Cells Int*. 2019 :9671206. doi: 10.1155/2019/9671206.
9. Piotto C, Julier Z, Martino MM. Immune Regulation of Tissue Repair and Regeneration via miRNAs-New Therapeutic Target. *Front Bioeng Biotechnol*. 2018 Jul 13;6:98. doi: 10.3389/fbioe.2018.00098.

Авторы

Базарный Владимир Викторович
ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет Минздрава России
Доктор медицинских наук, профессор кафедры клинической лабораторной диагностики и бактериологии
Российская Федерация, 620028 г. Екатеринбург, ул. Репина 3
vlad-bazarny@yandex.ru

Маклакова Ирина Юрьевна
ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет Минздрава России
Кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической физиологии
Российская Федерация, 620028 г. Екатеринбург, ул. Репина 3
ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»
Старший научный сотрудник
Российская Федерация, 620026 г. Екатеринбург, ул. Соболева 21
makliu@mail.ru

Гребнев Дмитрий Юрьевич
ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет Минздрава России
Доктор медицинских наук, заведующий кафедрой патологической физиологии
Российская Федерация, 620028 г. Екатеринбург, ул. Репина 3
ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»
Старший научный сотрудник
Российская Федерация, 620026, г. Екатеринбург, ул. Соболева 21
dr-grebnev77@mail.ru

Юсупова Виктория Чаукатовна
ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет Минздрава России
Ассистент кафедры патологической физиологии
Российская Федерация, 620028 г. Екатеринбург, ул. Репина 3
yusupova1@inbox.ru

Петрунина Екатерина Михайловна
Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии - филиал ФГБУ «НМИЦ ФПИ» Минздрава России
Научный сотрудник
Российская Федерация, 620039 г. Екатеринбург, 22-го Партсъезда, 50
ekaterina_b89@list.ru

Authors

Bazarniy Vladimir Viktorovich
Ural State Medical University of the Ministry of Health of Russia
MD, PhD, Professor of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics and Bacteriology,
3 Repin St., Ekaterinburg, 620078, Russian Federation
vlad-bazarny@yandex.ru

Maklakova Irina Yuryevna
Ural State Medical University of the Ministry of Health of Russia
PhD in Medical Sciences, Senior Associate Professor of the Department of Pathological Physiology
3 Repin St., Ekaterinburg, 620078, Russian Federation
State Autonomous Institution of Health "Institute of Medical Cell Technologies"
Senior Researcher
21, Sobolev St., Ekaterinburg, 620026, Russian Federation
makliu@mail.ru

Grebnev Dmitry Yuryevich
Ural State Medical University of the Ministry of Health of Russia
PhD in Medical Sciences, Head of the Department of Pathological Physiology
3 Repin St., Ekaterinburg, 620078, Russian Federation
State Autonomous Institution of Health "Institute of Medical Cell Technologies"
Senior Researcher
21, Sobolev St., Ekaterinburg, 620026, Russian Federation
dr-grebnev77@mail.ru

Yusupova Victoria Chaukatovna
Ural State Medical University of the Russian Ministry of Health
Postgraduate of the Department of Pathological Physiology
3 Repin St., Ekaterinburg, 620078, Russian Federation
yusupova1@inbox.ru

Petrulina Ekaterina Mikhailovna
Ural Scientific Research Institute of Phthisiopulmonology – a branch of National Medical Research Center for Physiopulmonology and Infectious Diseases, Ministry of Health of Russia
Research Assistant
50, 22nd Parts'ezd St., Ekaterinburg, 620039, Russian Federation
ekaterina_b89@list.ru