

УДК 616.36-003.93:576.54

*Базарный В.В.¹, Маклакова И.Ю.^{1,2}, Гребнев Д.Ю.^{1,2}, Гаврилов И.В.^{1,2}, В.Ч. Вахрушева¹***ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СОЧЕТАННОЙ АЛЛОГЕННОЙ
ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПЛАЦЕНТАРНЫХ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ И ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА РЕГЕНЕРАЦИЮ ПЕЧЕНИ
ПОСЛЕ ЕЕ РЕЗЕКЦИИ**¹ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет Минздрава России,
г. Екатеринбург, Российская Федерация;²ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий,
г. Екатеринбург, Российская Федерация*V.V. Bazarnyi¹, I.Yu. Maklakova^{1,2}, D.Yu. Grebnev^{1,2}, I.V. Gavrilov^{1,2}, V.Ch. Vahrusheva¹***STUDY OF THE EFFECT OF COMBINED ALLOGENIC
TRANSPLANTATION OF PLACENTAL MULTIPOTENT MESENHIMAL
STROMAL AND HEMATOPOETIC STEM CELLS ON LIVER
REGENERATION AFTER RESECTION**¹Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation;²Institute of Medical Cell Technologies, Yekaterinburg, Russian Federation

Резюме. Целью исследования было изучить изменения биохимических показателей периферической крови и морфометрических показателей печени на фоне проведения аллогенной сочетанной трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) и гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) после резекции печени.

Материалы и методы. Выделение культуры ММСК и ГСК осуществлялось из хориона плаценты 5 лабораторных животных мышей-самок возраста 3–4 месяца, массой 22–23 г, срок гестации 18 дней. Мононуклеарная фракция клеток была получена путем последовательной механической и ферментативной обработки ткани плаценты. Выделение ГСК осуществлялось методом позитивной иммуномагнитной сепарации по антигенам SCA-1 и CD 117. 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 в дозе 4 млн. клеток/кг и ГСК в дозе 330 тыс. клеток/кг. Введение клеток осуществлялось в физиологических условиях (без резекции печени) и через 1 час после субтотальной резекции печени. Производилась оценка биохимических показателей периферической крови и морфометрических показателей печени на 1, 3, 7 сутки после введения ММСК.

Результаты. В результате исследования получено, что сочетанная трансплантация ММСК и ГСК после резекции печени приводит к снижению уровня ферментов цитолиза (АСТ, АЛТ, щелочной фосфатазы), улучшению белоксинтетической функции печени (по-

Abstract. The aim of the study was to study changes in biochemical parameters of peripheral blood and liver morphometric parameters against the background of allogeneic combined transplantation of multipotent mesenchymal stromal cells (MMSC) and hematopoietic stem cells (HSC) after liver resection.

Materials and methods. The culture of MMSCs and HSCs was isolated from the placenta chorion of 5 laboratory animals of female mice 3–4 months old, weighing 22–23 g, gestational age 18 days. The mononuclear fraction of cells was obtained by sequential mechanical and enzymatic treatment of placental tissue. HSC was isolated by positive immunomagnetic separation by SCA-1 and CD 117 antigens. MMSC was cultured under conditions of a CO₂ incubator at a temperature of 37 °C with a carbon dioxide content of 5% and a humidity of 90%. For transplantation to laboratory animals, MMSCs were used at a dose of 4 million cells / kg and HSCs at a dose of 330 thousand cells / kg. The introduction of cells was carried out under physiological conditions (without liver resection) and 1 hour after subtotal liver resection. The biochemical indices of peripheral blood and morphometric indices of the liver were evaluated on days 1, 3, 7 after the administration of MMSC.

Results. As a result of the study, it was found that the combined transplantation of MMSCs and HSCs after liver resection leads to a decrease in the level of cytolysis enzymes (AST, ALT, alkaline phosphatase), and an improvement in the protein synthesizing function of the liver (increase in total protein, albumin levels). Also, after the introduction of cells against the background of liver resection, an increase in the area of the hepatocyte nucleus,

вышение показателей общего белка, уровня альбумина). Также после введения клеток на фоне резекции печени отмечено повышение площади ядра гепатоцитов, ядерно-цитоплазматического индекса (ЯЦИ), количества двуядерных клеток. Повышение уровня митотической активности, снижение выраженности апоптоза привело к увеличению количества гепатоцитов.

Заключение. Обнаружено восстановление морфофункциональных свойств печени после ее субтотальной резекции на фоне аллогенной сочетанной трансплантации ММСК и ГСК. Это выражается в улучшении биохимических показателей периферической крови печени, и морфометрических показателей печени. При этом выявлена активация как клеточной регенерации, так и внутриклеточной.

Ключевые слова: резекция печени, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, гемопоэтические стволовые клетки, клеточная регенерация, внутриклеточная регенерация

nuclear cytoplasmic index (NRC), and the number of binuclear cells was noted. An increase in the level of mitotic activity, a decrease in the severity of apoptosis, led to an increase in the number of hepatocytes.

Conclusion. The restoration of the morphological and functional properties of the liver after its subtotal resection against the background of allogeneic combined transplantation of MMSCs and HSCs was found. This is expressed in improving the biochemical parameters of the peripheral blood of the liver, and morphometric parameters of the liver. In this case, activation of both cellular regeneration and intracellular was revealed.

Keywords: liver resection, multipotent mesenchymal stromal cells, hematopoietic stem cells, cell regeneration, intracellular regeneration

Конфликт интересов отсутствует.

Контактная информация автора, ответственного за переписку:

Гребнев Дмитрий Юрьевич
dr-grebnev77@mail.ru

Дата поступления 10.12.2020 г.

Образец цитирования:

Базарный В.В., Маклакова И.Ю., Гребнев Д.Ю., Гаврилов И.В., Вахрушева В.Ч. Изучение влияния сочетанной аллогенной трансплантации плацентарных мультипотентных мезенхимальных стромальных и гемопоэтических стволовых клеток на регенерацию печени после ее резекции. Вестник уральской медицинской академической науки. 2020, Том 17, №1, с. 80–88, DOI: 10.22138/2500-0918-2020-17-1-80-88

There is no conflict of interest.

Contact details of the corresponding author:

Dmitry Yu. Grebnev
dr-grebnev77@mail.ru

Received 10.12.2020

For citation:

Bazarnyi V.V., Maklakova I.Yu., Grebnev D.Yu., Gavrilov I.V., Vahrusheva V.Ch. Study of the effect of combined allogeneic transplantation of placental multipotent mesenchymal stromal and hematopoietic stem cells on liver regeneration after resection. Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki. = Journal of Ural Medical Academic Science. 2020, Vol. 17, no. 1, pp. 80–88. DOI: 10.22138/2500-0918-2020-17-1-80-88 (In Russ)

Известно, что после резекции способность печени к регенерации существенно увеличивается. Активация регенерации органа происходит как на клеточном, так и на внутриклеточном уровнях [1]. При этом, обращает на себя внимание высокая летальность после обширной резекции печени, которая варьирует в диапазоне от 14 до 32% [2]. Это делает актуальным поиск эффективных способов восстановления регенерации печени после ее резекции. В нашем исследовании была использована сочетанная трансплантация аллогенных плацентарных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) и гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). ММСК можно сравнить с «фабрикой» по производству биологически активных веществ. ММСК способны вырабатывать различные факторы роста, противовоспалительные цитокины, синтезируют компоненты матрикса (фибронектин, ламинин, коллагены и протеогликаны) [3, 4]. При этом ММСК способны дифференцироваться в клетки стромы, которые обеспечивают синтез экстрацеллю-

After resection, the ability of the liver to regenerate is known to increase significantly. Moreover, the activation of organ regeneration occurs both at the cellular and intracellular levels [1]. At the same time, high mortality after extensive liver resection, which varies in the range from 14 to 32%, is noteworthy [2]. This makes it relevant to search for effective ways to restore liver regeneration after its resection. In our study, we used the combined transplantation of allogeneic placental multipotent mesenchymal stromal cells (MMSCs) and hematopoietic stem cells (HSCs). MMSC can be compared with a «factory» for the production of biologically active substances. MMSCs are capable of producing various growth factors, anti-inflammatory cytokines, and synthesize matrix components (fibronectin, laminin, collagens, and proteoglycans) [3, 4]. Moreover, MMSCs are able to differentiate into stromal cells, which provide the synthesis of an extracellular matrix that forms the microenvironment necessary for the proliferation and differentiation of stem cells [5, 6]. MMSC transplantation

лярного матрикса, формирующего микроокружение, необходимое для пролиферации и дифференцировки стволовых клеток [5, 6]. Трансплантация ММСК способна ускорить процесс приживления ГСК и, соответственно, процесс восстановления регенерации тканей [7, 8, 9]. В последние годы доказана способность ГСК стимулировать регенерацию печени путем слияния с гепатоцитами [10]. Наличие у ММСК способности к выработке иммуносупрессивных факторов (ИЛ 10, TGF β) делает возможным проведение аллогенной сочетанной трансплантации ММСК и ГСК [11]. Перспективным источником для выделения данных видов клеток является плацента. Известно, что ткань зрелой плаценты человека содержит на порядок большее количество ГСК, чем пуповинная кровь и костный мозг [12]. Получение плацентарных ММСК и ГСК возможно неоперативным путем. Учитывая биологические свойства ММСК и ГСК представляется перспективным изучение их влияния на регенерацию печени после ее резекции.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на 84 белых лабораторных мышках-самцах возраста 7-8 месяцев, массой 20-23 г. Производилось выделение культуры ММСК из хориона плаценты 5 лабораторных животных мышей-самок возраста 3-4 месяца, срок гестации 18 дней. Мононуклеарная фракция клеток была получена путем последовательной механической и ферментативной (раствор аккутазы (Millipore, США)) обработки ткани плаценты. Выделение ГСК осуществлялось методом позитивной иммуномагнитной сепарации по антигенам SCA-1 (StemCell Technologies, США) и CD 117 (StemCell Technologies, США) (X. Munira et al., 2009). Все эксперименты, уход и содержание осуществлялись 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.

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 β 1, CD 54, collagen type I и fibronectin) и негативные маркеры (антитела к CD 14, CD 45). Изучение функциональных свойств выделенных клеток было проведено путем направленной дифференцировки полу-

is able to accelerate the healing process of HSCs and, accordingly, the process of restoration of tissue regeneration [7, 8, 9]. In recent years, the ability of HSCs to stimulate liver regeneration by fusion with hepatocytes has been proven [10]. The presence in MMSCs of the ability to generate immunosuppressive factors (IL 10, TGF β) makes it possible to conduct allogeneic combined transplantation of MMSCs and HSCs [11]. A promising source for isolating these types of cells is the placenta. It is known that the tissue of mature human placenta contains an order of magnitude greater amount of HSCs than cord blood and bone marrow [12]. Obtaining placental MMSC and HSC is possible non-operatively. Given the biological properties of MMSC and HSC, it seems promising to study their effect on liver regeneration after its resection.

Materials and methods

The experiments were performed on 84 white laboratory male mice aged 7-8 months, weighing 20-23 g. The MMSC culture was isolated from the placenta chorion of 5 laboratory animals of female mice 3-4 months old, gestational age 18 days. The mononuclear fraction of the cells was obtained by sequential mechanical and enzymatic processing of placental tissue. HSCs were isolated by positive immunomagnetic separation according to SCA-1 antigens (StemCell Technologies, USA) and CD 117 (StemCell Technologies, USA) (X. Munira et al., 2009). All experiments, care and maintenance were carried out in accordance with Directive No. 63 of September 22, 2010 of the Presidium and the European Parliament "On the protection of animals used for scientific research" and Order of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 267 of 06.19.2003 "On the approval of laboratory practice rules".

The MMSC was cultivated under the conditions of a CO₂ incubator (Termo Scientific, USA) at a temperature of 37°C with a carbon dioxide content of 5% and a humidity of 90%. MMSCs of the third passage were used for transplantation to laboratory animals. MMSC identification was carried out by immunocytochemical method using a Mesenchymal Stem Cell Characterization Kit (Millipore, USA) containing positive (antibodies to integrin β 1, CD 54, collagen type I and fibronectin) and negative markers (antibodies to CD 14, CD 45). The study of the functional properties of the selected cells was carried out by directed differentiation of the obtained culture in the directions characteristic for MMSCs - in adipocytic and osteogenic. HSC identification was carried out on a Beckman Coulter Navios flow cytometer. In the suspension of transplanted cells, the content of HSCs with immunophenotype positive for CD117, Sca-1 and negative for Lin- (CD45, C3e, Ly-6G, M1 / 70, Ter-119) was evaluated. The cell content after immunomagnetic separation with the immunophenotype CD117 +, Sca-1 +, Lin- was 80-93%. Cell viability was determined using supravital staining with trypan blue solution and before transplantation was 95 - 97%. MMSC and HSC were injected intravenously into the animals of the experimental group, respectively, at a dose of 4

ченной культуры в направлениях, характерных для ММСК — в адипоцитарном и остеогенном. Идентификация ГСК была проведена на проточном цитометре Beckman Coulter Navios. В суспензии трансплантируемых клеток оценивалось содержание ГСК с иммунофенотипом положительных по CD117, Sca-1 и отрицательных по Lin- (CD45, C3e, Ly-6G, M1/70, Ter-119). Содержание клеток после иммуномагнитной сепарации с иммунофенотипом CD117+, Sca-1+, Lin- составило 80-93%. Жизнеспособность клеток была определена с помощью суправитальной окраски раствором трипанового синего и перед трансплантацией составила 95–97%. Животным опытной группы внутривенно вводились ММСК и ГСК соответственно в дозе 4 млн клеток/кг и 330 тыс. клеток/кг, суспендированные в 0,2 мл 0,9% раствора NaCl. Животным контрольной группы вводили 0,9% раствор NaCl — 0,2 мл внутривенно. Внутривенные введения осуществлялись через 1 час после субтотальной резекции однократно. Резекция 2/3 печени у лабораторных мышей выполнена по методике С. Mitchell и Н. Willenbring [11]. Исследовалось влияние сочетанной трансплантации ММСК и ГСК на биохимические показатели периферической крови и морфометрические показатели печени в физиологических условиях и после субтотальной резекции на 1, 3, 7 сутки. Из опыта животных выводили декапитацией под легким эфирным наркозом.

Изготавливали гистологические срезы печени толщиной 3-5 мкм, окрашивали гематоксилином-эозином. Для морфометрического анализа данных использовали компьютерную программу анализа изображений (Biovision, Россия). С этой целью производили микрофотосъемку случайных полей зрения гистологических препаратов цифровой камерой OLYMPUS XC30 на базе микроскопа OLYMPUS BX51 (OLYMPUS, Япония) при увеличении $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$, $\times 600$, $\times 1000$ (не менее 10 полей зрения в каждом гистологическом срезе).

Производилась оценка следующих морфометрических показателей печени: количество гепатоцитов на 1 мм^2 , площадь гепатоцитов, площадь ядра гепатоцита, площадь цитоплазмы гепатоцита = площадь гепатоцита – площадь ядра гепатоцита, ядерно-цитоплазматический индекс (ЯЦИ), количество двуядерных гепатоцитов на 1 мм^2 , 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.

million cells / kg and 330 thousand cells / kg, suspended in 0.2 ml of a 0.9% NaCl solution. The control group animals were injected with 0.9% NaCl solution — 0.2 ml intravenously. Intravenous administration was carried out 1 hour after subtotal resection once. Resection of 2/3 of the liver in laboratory mice was performed according to the method of С. Mitchell and Н. Willenbring [11]. The effect of combined transplantation of MMSCs and HSCs on the biochemical parameters of peripheral blood and morphometric parameters of the liver under physiological conditions and after subtotal resection on days 1, 3, 7 was studied. From the experience of the animals was removed by decapitation under mild ether anesthesia.

Histological sections of the liver with a thickness of 3-5 μm were made, stained with hematoxylin-eosin. For morphometric data analysis, a computer image analysis program (Biovision, Russia) was used. For this purpose, micrographs were taken of random fields of view of histological preparations with an OLYMPUS XC30 digital camera based on an OLYMPUS BX51 microscope (OLYMPUS, Japan) at a magnification of $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$, $\times 600$, $\times 1000$ (at least 10 fields of view in each histological section)

The following morphometric indicators of the liver were evaluated: hepatocyte number per 1 mm^2 , hepatocyte area, hepatocyte core area, hepatocyte cytoplasm area = hepatocyte area - hepatocyte core area, nuclear cytoplasmic index (NRC), number of binuclear hepatocytes per 1 mm^2 , mitotic index (MI), apoptotic index (AI). The nuclear cytoplasmic index (NRC) was determined as the ratio of the nucleus and cytoplasm of the cell. Mitotic, apoptotic indices were expressed in ppm (‰). The mitotic index was defined as the ratio of the number of cells in the state of mitosis to the total number of hepatocytes counted. Verification of the severity of apoptosis was carried out using the ApopTag® Peroxidase In Situ Oligo Ligation (ISOL) method (Millipore, USA). The apoptotic index was defined as the ratio of the number of cells in the state of apoptosis to the total number of hepatocytes counted.

Assessment of biochemical parameters of peripheral blood was performed on a Chem Well 2910 (Combi) automated biochemical and enzyme immunoassay analyzer. The following biochemical parameters were studied: total protein (biuret reaction), albumin (colorimetric method with bromocresol green), urea (urease-salicylate-hypochlorite method, Bertlot reaction), glucose (Trinder reaction), total bilirubin (Yendrashek-Grofotersatz method, aspart (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP). When determining biochemical parameters, sets of Olvex Diagnosticum, Russia were used.

The significance of differences in the compared samples was carried out using the nonparametric (rank) Mann-Whitney method. Statistical data processing was performed using the SPSS Statistics software package (version 17.0).

Research results

When analyzing biochemical parameters of peripheral

Оценка биохимических показателей периферической крови производилась на автоматическом биохимическом и иммуноферментном анализаторе Chem Well 2910 (Combi). Изучались следующие биохимические показатели: общий белок (биуретовая реакция), альбумин (колориметрический метод с бромкрезоловым зеленым), мочевины (уреазо-салицилат-гипохлоритный метод, реакция Бергтопта), глюкоза (реакция Триндера), общий билирубин (Метод Йендрашека-Грофа), аспартатаминотрансфераза (АСТ), аланинаминотрансфераза (АЛТ), щелочная фосфатаза (ЩФ). При определении биохимических показателей использовались наборы компании «Ольвекс Диагностикум», Россия.

Достоверность отличий в сравниваемых выборках проведена с применением непараметрического (рангового) метода Манна-Уитни. Статистическая обработка данных проведена с помощью программного пакета SPSS Statistics (версия 17,0).

Результаты исследования

При анализе биохимических показателей периферической крови и морфометрических показателей печени у лабораторных животных без резекции печени на 1, 3, 7 сутки после сочетанного введения ММСК и ГСК достоверных различий с контрольной группой не обнаружено.

При изучении биохимических показателей периферической крови и морфометрических показателей печени на 1 сутки после резекции печени на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК отличий от данных контрольной группы, также как в физиологических условиях, не выявлено.

На 3 сутки после резекции печени на фоне введения плацентарных ММСК и ГСК у лабораторных животных выявлено снижение показателей АСТ на 23,7%, АЛТ на 24,0%, щелочной фосфатазы на 22,3% (Таблица 1).

Таблица 1

Биохимические показатели крови лабораторных мышей на 3 сутки после субтотальной резекции печени на фоне введения ММСК и ГСК, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	ММСК+ГСК
Общий белок, г/л	50,03±4,82 *	54,1±4,83 *
Альбумин, г/л	19,80±2,51 *	21,71±1,79 *
Мочевина, ммоль/л	4,37±0,33 *	4,54±0,69 *
Глюкоза, ммоль/л	3,66±0,29 *	3,71±0,36 *
Общий билирубин, мкмоль/л	21,99±5,47 *	19,84±1,85 *
АСТ, Ед/л	209,53±13,85 *	159,83±15,8 **, **
АЛТ, Ед/л	155,24±9,38 *	117,94±10,95 **, **
Щел. Фосфатаза, Ед/л	106,67±10,45 *	82,90±11,34 **, **

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

blood and morphometric parameters of the liver in laboratory animals without liver resection on days 1, 3, 7 after the combined administration of MMSC and HSC, no significant differences were found with the control group.

When studying biochemical parameters of peripheral blood and morphometric parameters of the liver on the 1st day after liver resection against the background of combined transplantation of MMSC and HSC, there were no differences from the control group data as well as under physiological conditions.

On the 3rd day after liver resection against the background of the introduction of placental MMSC and HSC, laboratory animals showed a decrease in AST by 23.7%, ALT by 24.0%, alkaline phosphatase by 22.3% (table 1).

Table 1

Biochemical blood parameters of laboratory mice on the 3rd day after subtotal resection of the liver on the background of the introduction of MMSC and HSC, $M \pm m$, $n=7$

Parameters	Value	
	NaCl	MMSC+ HSC
Total protein, g/l	50.03±4.82 *	54.1±4.83 *
Albumin, g/l	19.80±2.51 *	21.71±1.79 *
Urea, mmol / l	4.37±0.33 *	4.54±0.69 *
Glucose, mmol / l	3.66±0.29 *	3.71±0.36 *
Total bilirubin, μ mol / l	21.99±5.47 *	19.84±1.85 *
AST, U/l	209.53±13.85 *	159.83±15.8 **, **
ALT, U/l	155.24±9.38 *	117.94±10.95 **, **
alkaline phosphatase U/l	106.67±10.45 *	82.90±11.34 **, **

Note: * — difference from the intact group of mature laboratory animals, significantly with $p < 0.05$; ** — difference from the control group of mature laboratory animals, significantly with $p < 0.05$.

By analyzing the biochemical parameters of the peripheral blood of laboratory animals on the 7th day after liver resection, an increase in total protein, albumin, urea, and an increase in glucose were noted against the background of the administration of MMSC and HSC. There was also a decrease in the level of enzymes: AST, ALT, alkaline phosphatase to the values of intact animals (table 2).

When studying morphometric parameters of the liver on the 3rd day after liver resection in animals that were injected with MMSC and HSC, an increase in the area of the hepatocyte nucleus by 25, 1%, an increase in Nuclear-cytoplasmic ratio by 20.0%, an increase in the number of binuclear cells by 24.2% was found. Also revealed a decrease in the apoptotic index by 25.5% (table 3).

When analyzing morphometric parameters on the 7th day after liver resection against the background of the administration of MMSC and HSC, the experimental group showed an increase in the number of hepatocytes by 21.5%, an increase in the area of the nucleus of hepatocytes by 20.9%, an increase in Nuclear-cytoplasmic ratio by

Анализируя биохимические показатели периферической крови лабораторных животных на 7 сутки после резекции печени на фоне введения ММСК и ГСК отмечено повышение общего белка, альбумина, мочевины, повышение уровня глюкозы. Также отмечено снижение уровня ферментов: АСТ, АЛТ, щелочной фосфатазы до значений интактных животных (таблица 2).

Таблица 2

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

Показатели	Значение	
	NaCl	ММСК+ГСК
Общий белок	44,27±3,62 *	54,10±3,69 * **
Альбумин	20,59±1,90 *	25,03±3,74 * **
Мочевина	4,57±0,46 *	5,77±0,48 **
Глюкоза	4,30±0,29 *	5,20±0,34 * **
Общий билирубин	15,41±2,76 *	14,06±1,28 *
АСТ	153,86±16,96 *	111,94±12,04 **
АЛТ	137,10±16,29 *	96,24±9,21 **
Щел. фосфатаза	83,11±5,93 *	65,59±3,73 **

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

При изучении морфометрических показателей печени на 3 сутки после резекции печени у животных, которым вводили ММСК и ГСК, обнаружено увеличение площади ядра гепатоцитов на 25, 1%, повышение ЯЦИ на 20,0%, повышение количества двуядерных клеток на 24,2%. Также выявлено снижение апоптотического индекса на 25,5% (таблица 3).

Таблица 3

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

Показатели	Значение	
	NaCl	ММСК+ГСК
Количество гепатоцитов на 1 мм ²	2489,91±66,89 *	2557,0±77,71 *
Площадь гепатоцитов, мкм ²	331,81±24,02 *	338,0±20,57 *
Площадь ядра гепатоцитов, мкм ²	67,13±7,01 *	84,0±8,29 * **
Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм ²	243,64±19,25	254,0±12,29
ЯЦИ	0,27±0,01*	0,33±0,02 * **
Количество двуядерных гепатоцитов на мм ²	380,97±10,15 *	473,14±23,55 * **
МИ, ‰	8,1±0,60 *	8,2±0,49 *
АИ, ‰	2,13±0,20*	1,59±0,13* **

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

28.43%, an increase in the number of binuclear cells by 22.3%. An increase in the mitotic index by 27.2% and a decrease in the apoptotic index by 26.6% were also noted (table 4).

Table 2

Blood biochemical parameters of mature laboratory mice on the 7th day after liver resection against the background of the introduction of MMSC and HSC, $M \pm m$, $n = 7$

Parameters	Value	
	NaCl	MMSC+ HSC
Total protein, g/l	44.27±3.62 *	54.10±3.69 * **
Albumin, g/l	20.59±1.90 *	25.03±3.74 * **
Urea, mmol/l	4.57±0.46 *	5.77±0.48 **
Glucose, mmol/l	4.30±0.29 *	5.20±0.34 * **
Total bilirubin, μmol/l	15.41±2.76 *	14.06±1.28 *
AST, U/l	153.86±16.96 *	111.94±12.04 **
ALT, U/l	137.10±16.29 *	96.24±9.21 **
alkaline phosphatase U/l	83.11±5.93 *	65.59±3.73 **

Note: * — difference from the intact group of mature laboratory animals, significantly with $p < 0.05$; ** — difference from the control group of mature laboratory animals, significantly with $p < 0.05$.

Table 3

Morphometric parameters of the liver of mature laboratory mice on the 3rd day after liver resection against the background of the introduction of MMSC and HSC, $M \pm m$, $n = 7$

Parameters	Value	
	NaCl	MMSC+ HSC
Number of hepatocytes per 1 mm ²	2489.91±66.89 *	2557.0±77.71 *
Hepatocyte area, μm ²	331.81±24.02 *	338.0±20.57 *
The area of nucleus of hepatocytes, μm ²	67.13±7.01 *	84.0±8.29 * **
The area of the cytoplasm of hepatocytes, μm ²	243.64±19.25	254.0±12.29
Nuclear-cytoplasmic ratio	0.27±0.01*	0.33±0.02 * **
Number of binuclear hepatocytes per mm ²	380.97±10.15 *	473.14±23.55 * **
Mitotic index, ‰	8.1±0.60 *	8.2±0.49 *
Apoptotic index, ‰	2.13±0.20*	1.59±0.13* **

Note: * — difference from the intact subgroup of mature laboratory animals, significantly with $p < 0.05$; ** — difference from the control subgroup of mature laboratory animals, significantly with $p < 0.05$.

При анализе морфометрических показателей на 7 сутки после резекции печени на фоне введения ММСК и ГСК в опытной группе отмечено повышение количества гепатоцитов на 21,5 %, повышение площади ядра гепатоцитов на 20,9 %, возрастание ЯЦИ на 28,43 %, увеличение количества двухядерных клеток на 22,3 %. Также отмечено увеличение митотического индекса на 27,2 % и снижение апоптотического индекса на 26,6 % (таблица 4).

Таблица 4
Морфометрические показатели печени зрелых лабораторных мышей на 7 сутки после резекции печени на фоне введения ММСК и ГСК, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	ММСК+ГСК
Количество гепатоцитов на 1 мм ²	1918,29±82,04 *	2330,14±112,98* **
Площадь гепатоцитов, мкм ²	286,41±22,44	289±23,63
Площадь ядра гепатоцитов, мкм ²	63,39±5,12 *	78,07±6,32* **
Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм ²	223,03±17,97	211,36±17,52
ЯЦИ	0,29±0,02 *	0,37±0,01* **
Количество двухядерных гепатоцитов на мм ²	320,77±10,64 *	392,43±20,94* **
МИ, ‰	4,51±0,47 *	5,74±0,49* **
АИ, ‰	1,25±0,09*	0,92±0,09* **

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

Заключение

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что сочетанная трансплантация плацентарных ММСК и ГСК способна активировать регенерацию печени после ее субтотальной резекции. Введение данных видов клеток обеспечивает восстановление белоксинтетической функции печени, нормализация показателей ферментов цитолиза. Изменения со стороны структуры печени в ответ на сочетанную трансплантацию клеток выражаются в активации механизмов клеточной и внутриклеточной регенерации, снижении выраженности апоптоза. Уменьшение запрограммированной клеточной гибели гепатоцитов можно объяснить способностью ММСК индуцировать в них выработку белков теплового шока путем формирования межклеточных контактов. Белки теплового шока, в свою очередь, повышают устойчивость структурных и функциональных белков от разрушения. Обеспечивая таким образом устойчивость ферментов репарации, достигается антиапоптогенный эффект. Активация внутриклеточной регенерации может быть обусловлена слиянием ММСК и ГСК с гепатоцитами. Способность ММСК к выработке факторов роста (SCF, HGF) обеспечивает активацию клеточной регенерации.

Table 4
Morphometric parameters of the liver of mature laboratory mice on the 7th day after liver resection against the background of the introduction of MMSC and HSC, $M \pm m$, $n = 7$

Parameters	Value	
	NaCl	MMSC+ HSC
Number of hepatocytes per 1 mm ²	1918.29±82.04 *	2330.14±112.98* **
Hepatocyte area, μm ²	286.41±22.44	289±23.63
The area of nucleus of hepatocytes, μm ²	63.39±5.12 *	78.07±6.32* **
The area of the cytoplasm of hepatocytes, μm ²	223.03±17.97	211.36±17.52
Nuclear-cytoplasmic ratio	0.29±0.02 *	0.37±0.01* **
Number of binuclear hepatocytes per mm ²	320.77±10.64 *	392.43±20.94* **
Mitotic index, ‰	4.51±0.47 *	5.74±0.49* **
Apoptotic index, ‰	1.25±0.09*	0.92±0.09* **

Note: * — difference from the intact subgroup of mature laboratory animals, significantly with $p < 0.05$; ** — difference from the control subgroup of mature laboratory animals, significantly with $p < 0.05$.

Conclusion

Studies have shown that the combined transplantation of placental MMSCs and HSCs is able to activate liver regeneration after its subtotal resection. The introduction of these types of cells ensures the restoration of protein synthesis of the liver, normalization of cytolysis enzyme parameters. Changes in the structure of the liver in response to combined cell transplantation are expressed in the activation of mechanisms of cellular and intracellular regeneration, a decrease in the severity of apoptosis. The decrease in the programmed cell death of hepatocytes can be explained by the ability of MMSCs to induce the production of heat shock proteins in them by forming intercellular contacts. Heat shock proteins, in turn, increase the stability of structural and functional proteins from destruction. Thus ensuring the stability of repair enzymes, an anti-apoptogenic effect is achieved. Activation of intracellular regeneration may be due to the fusion of MMSCs and HSCs with hepatocytes. The ability of MMSCs to produce growth factors (SCF, HGF) provides activation of cell regeneration.

ЛИТЕРАТУРА

1. Michalopoulos G.K. Liver regeneration // J. Cell Physiol. – 2007. – V. 213, № 2. – P. 286–300.
2. Badgwell, B., Ribeco D., Vauthey, J. (2008). Surgical Management (Resection). In J. Geschwind and M.Soulen (Eds), International Oncology: Principles and Practice (pp. 121-134). Cambridge: Cambridge University Press. Doi: 10.1017/CB09780511722226.013
3. Prockop D.J., Oh J.Y Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation // Mol. Ther. – 2012. – Vol. 20(1) – P.14-20.
4. Sun L., Fan X., Zhang L. et. al. Bone mesenchymal stem cell transplantation via four routes for the treatment of acute liver failure in rats // International journal of molecular medicine. - 2014. - 34. - 987-96.
5. Wu XB, Tao R. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells. Hepatobiliary Pancreat Dis Int 2012; 11: 360-371 [PMID:22893462 DOI: 10.1016/S1499-3872(12)60193-3].
6. Ikebe C., Suzuki K. Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Therapy: Optimization of Cell Preparation Protocols // Biomed Research International. 2014. P.951512.
7. Maklakova, I.Y. Effects of combined transplantation of multipotent mesenchymal stromal and hemopoietic stem cell on regeneration of the hemopoietic tissue / I.Y. Maklakova, D.Y. Grebnev // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2017. – Vol. 163, №1. – P. 61-64.
8. Маклакова И.Ю., Гребнев Д.Ю., Ястребов А.П. Влияние экстремальных факторов на хоуминг мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2015. Т. 59. № 4. С. 82-86.
9. Сазонов С.В. Т-лимфоциты регуляторы активности пролиферации клеток в ткани (научный обзор) / Вестник Уральской медицинской академической науки. 2007. № 1. С. 91-94.
10. Pilat N., Unger L., Berlakovich G. A. Implication for Bone Marrow Derived Stem Cells in Hepatocyte Regeneration after Orthotopic Liver Transplantation/Hindawi Publishing Corporation International Journal of Hepatology. Vol. 2013, Article ID 310612, P. 7. doi 10.1155/2013/310612.
11. Wang Y, Chen X, Cao W, Shi Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. Nat Immunol 2014. Vol. 15. P. 1009–1016.
12. Сериков В.Б., Куйперс Ф. Плацента человека как источник гемопоэтических стволовых клеток. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. Том III. № 9 2008. С. 51-56.

REFERENCES

1. Michalopoulos G.K. Liver regeneration. J. Cell Physiol. – 2007. – V. 213, № 2. – P. 286–300.
2. Badgwell, B., Ribeco D., Vauthey, J. (2008). Surgical Management (Resection). In J. Geschwind and M.Soulen (Eds), International Oncology: Principles and Practice (pp. 121-134). Cambridge: Cambridge University Press. Doi: 10.1017/CB09780511722226.013
3. Prockop D.J., Oh J.Y Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation // Mol. Ther. – 2012. – Vol. 20(1) – P.14-20.
4. Sun L., Fan X., Zhang L. et. al. Bone mesenchymal stem cell transplantation via four routes for the treatment of acute liver failure in rats. International journal of molecular medicine. - 2014. - 34. - 987-96.
5. Wu XB, Tao R. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells. Hepatobiliary Pancreat Dis Int 2012; 11: 360-371 [PMID:22893462 DOI: 10.1016/S1499-3872(12)60193-3].
6. Ikebe C., Suzuki K. Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Therapy: Optimization of Cell Preparation Protocols. Biomed Research International. 2014. P.951512.
7. Maklakova, I.Y. Effects of combined transplantation of multipotent mesenchymal stromal and hemopoietic stem cell on regeneration of the hemopoietic tissue / I.Y. Maklakova, D.Y. Grebnev. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2017. – Vol. 163, №1. – P. 61-64.
8. Maklakova, I.Y, Grebnev D.Y., Yastrebov A.P. The influence of extreme factors on the homing of multipotent mesenchymal stromal cells /Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya. 2015. V. 59. № 4. P. 82-86. {In Russ.}
9. Sazonov S.V. T-lymphocytes regulators of cell proliferation activity in tissue (scientific review). Vestnik Ural'skoj medicinskoj akademicheskoy nauki. 2007. № 1. P. 91-94. {In Russ.}
10. Pilat N., Unger L., Berlakovich G. A. Implication for Bone Marrow Derived Stem Cells in Hepatocyte Regeneration after Orthotopic Liver Transplantation. Hindawi Publishing Corporation International Journal of Hepatology. Vol. 2013, Article ID 310612, P. 7. doi 10.1155/2013/310612.
11. Wang Y, Chen X, Cao W, Shi Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. Nat Immunol 2014. Vol. 15. P. 1009–1016.
12. Serikov V.B., Kuypers F. Human placenta as a source of hematopoietic stem cells. Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya. Vol. III. № 9 2008. P. 51-56. {In Russ.}

Авторы

Базарный Владимир Викторович
Уральский государственный медицинский университет
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

Уральский государственный медицинский университет
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. Карла Маркса 22а
makliu@mail.ru

Гребнев Дмитрий Юрьевич

Уральский государственный медицинский университет
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. Карла Маркса 22а
dr-grebnev77@mail.ru

Гаврилов Илья Валерьевич

Уральский государственный медицинский университет
Кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии
Российская Федерация, 620028, г. Екатеринбург, ул. Репина 3
ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»
Старший научный сотрудник
Российская Федерация, 620026, г. Екатеринбург, ул. Карла Маркса 22а
given18@yandex.ru

Вахрушева Виктория Чаукатовна

Уральский государственный медицинский университет
Аспирант кафедры патологической физиологии
Российская Федерация, 620028 г. Екатеринбург, ул. Репина 3
yusupova1@inbox.ru

Authors

Vladimir V. Bazarnyi
Ural State Medical University
Dr. Sci. (Med.), Professor of the Department of clinical laboratory diagnostics and bacteriology,
3 Repin str. Yekaterinburg Russian Federation 620028
vlad-bazarny@yandex.ru

Irina Yu. Maklakova

Ural State Medical University
Cand. Sci. (Med.), Associate Professor of the Department of pathological physiology
3 Repin str. Yekaterinburg Russian Federation 620028
Institute of Medical Cell Technologies
Senior researcher
22a Karl Marx str. Yekaterinburg Russian Federation 620026
makliu@mail.ru

Dmitry Yu. Grebnev

Ural State Medical University
Dr. Sci. (Med.), Head of the Department of pathological physiology
3 Repin str. Yekaterinburg Russian Federation 620028
Institute of Medical Cell Technologies
Senior researcher
22a Karl Marx str. Yekaterinburg Russian Federation 620026
dr-grebnev77@mail.ru

Ilya V. Gavrilov

Ural State Medical University
Cand. Sci. (Bio.), Associate Professor
3 Repin str. Yekaterinburg Russian Federation 620028
Institute of Medical Cell Technologies
Senior researcher
22a Karl Marx str. Yekaterinburg Russian Federation 620026
given18@yandex.ru

Victoria Ch. Vahrusheva

Ural State Medical University
Postgraduate of the Department of Pathological Physiology
3 Repin str. Yekaterinburg Russian Federation 620028
yusupova1@inbox.ru