

УДК 616.36-003.93:576.54

*В.Ч. Вахрушева¹, И.Ю. Маклакова^{1,2}, Д.Ю. Гребнев^{1,2},
В.В. Базарный¹, И.В. Гаврилов^{1,2}*

**ОЦЕНКА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ПЕЧЕНИ
ПОСЛЕ ЕЕ РЕЗЕКЦИИ НА ФОНЕ ВВЕДЕНИЯ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК
В УСЛОВИЯХ СТАРЕНИЯ ОРГАНИЗМА**

¹ ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет,
г. Екатеринбург, Российская Федерация;
² ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий,
г. Екатеринбург, Российская Федерация

V.Ch. Vahrusheva¹, I.Yu. Maklakova^{1,2}, D.Yu. Grebnev^{1,2}, V.V. Bazarnyi¹, I.V. Gavrilo^{1,2}
**ASSESSMENT OF MORPHOFUNCTIONAL CHANGES OF THE LIVER
AFTER ITS RESECTION ON THE BACKGROUND OF INTRODUCTION
OF MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELLS
IN AGING CONDITIONS**

¹ Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation;
² Institute of Medical Cell Technologies, Yekaterinburg, Russian Federation

Резюме. *Цель исследования* — изучить влияние трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) на регенерацию печени в физиологических условиях и после ее резекции в условиях старения организма. *Материалы и методы.* Выделение культуры ММСК осуществлялось из хориона плаценты 5 лабораторных животных мышей-самок возраста 3-4 месяца, массой 22-23 г, срок гестации 18 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. Введение ММСК осуществлялось в физиологических условиях (без резекции печени) и через 1 час после субтотальной резекции печени зрелым и старым лабораторным животным. Производилась оценка биохимических показателей периферической крови и морфометрических показателей печени на 1, 3, 7 сутки после введения ММСК. *Результаты.* Трансплантация ММСК зрелым и старым лабораторным животным без резекции печени не приводит к изменениям биохимических показателей периферической крови и морфометрических показателей печени. На 3 сутки после резекции печени на фоне введения ММСК у зрелых лабораторных животных обнаружено снижение уровня АСТ, АЛТ, щелочной фосфатазы по сравнению с контрольной подгруппой зрелых животных. У старых животных этот эффект появляется на 7 сутки. У зрелых и старых животных обнаружено повышение площади ядра гепатоцитов, ядерно-цитоплазматического ин-

Abstract. *The aim of the study* was to study the effect of multipotent mesenchymal stromal cell transplantation (MMSC) on liver regeneration under physiological conditions and after its resection under aging conditions. *Materials and methods.* Isolation of MMSC culture was carried out from the placenta chorion of 5 laboratory animal mice-females aged 3-4 months, weighing 22-23 g, gestation period of 18 days. MMSC was cultured in a CO₂ incubator at a temperature of 37°C with a carbon dioxide content of 5% and a humidity of 90%. MMSCs of the third passage at a dose of 4 million cells/kg were used for transplantation to laboratory animals. MMSCs were administered under physiological conditions (without liver resection) and 1 hour after Subtotal liver resection to Mature and old laboratory animals. Biochemical indices of peripheral blood and liver morphometric indices were evaluated on 1, 3, 7 days after MMSC administration. *Results.* Transplantation of MMSCs to mature and old laboratory animals without liver resection does not lead to changes in biochemical parameters of peripheral blood and morphometric parameters of the liver. On day 3 after liver resection on the background of MMSC administration in mature laboratory animals, a decrease in the level of AST, ALT, alkaline phosphatase was found in comparison with the control subgroup of mature animals. Have old animals this effect emerges on 7 clock. In mature and old animals, an increase in the area of the nucleus of hepatocytes, nuclear cytoplasmic index (YCI), the number of binuclear cells was found. In mature laboratory animals revealed a decrease in apoptosis, increased mitotic activity, which led to an increase in the number of hepatocytes. At the

декса (ЯЦИ), количества двуядерных клеток. У зрелых лабораторных животных выявлено снижение уровня апоптоза, повышение митотической активности, что привело к увеличению количества гепатоцитов. В то же время у старых животных отмечено уменьшение апоптотического индекса, уровень митозов, количество гепатоцитов не отличалось от данных контрольной подгруппы. **Заключение.** Установлено, что трансплантация ММСК зрелым и старым лабораторным животным после субтотальной резекции печени стимулирует ее регенерацию. У зрелых животных выявлена активация клеточной регенерации (увеличение количества гепатоцитов) и внутриклеточной (повышение количества двуядерных клеток, ЯЦИ), тогда как у старых — лишь за счет активации внутриклеточной регенерации.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, регенерация печени, биохимические показатели, морфометрические показатели

same time, in older animals, there was a decrease in the apoptotic index, the level of mitosis, the number of hepatocytes did not differ from the data of the control subgroup. **Conclusion.** It was found that transplantation of MMSCs to mature and old laboratory animals after Subtotal resection of the liver stimulates its regeneration. In mature animals, activation of cellular regeneration (increase in the number of hepatocytes) and intracellular (increase in the number of binuclear cells, YCI) was revealed, whereas in old animals—only due to the activation of intracellular regeneration.

Keywords: multipotent mesenchymal stromal cells, liver regeneration, biochemical parameters, morphometric parameters

Конфликт интересов отсутствует.

Контактная информация автора, ответственного за переписку:

Гребнев Дмитрий Юрьевич
dr-grebnev77@mail.ru

Дата поступления 10.12.2020 г.

Образец цитирования:

Вахрушева В.Ч., Маклакова И.Ю., Гребнев Д.Ю., Базарный В.В., Гаврилов И.В. Оценка морфофункциональных изменений печени после ее резекции на фоне введения мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в условиях старения организма. Вестник уральской медицинской академической науки. 2020, Том 17, №1, с. 89–97, DOI: 10.22138/2500-0918-2020-17-1-89-97

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:

Vahrusheva V.Ch., Maklakova I.Yu., Grebnev D.Yu., Bazarnyi V.V., Gavrilov I.V. Assessment of morphofunctional changes of the liver after its resection on the background of introduction of multipotent mesenchymal stromal cells in aging conditions. Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki. = Journal of Ural Medical Academic Science. 2020, Vol. 17, no. 1, pp. 89–97. DOI: 10.22138/2500-0918-2020-17-1-89-97 (In Russ)

Известно, что печень в физиологических условиях обладает низкой скоростью клеточного обновления [1]. Наличие нескольких способов регенерации печени (клеточный и внутриклеточный), а также их низкий уровень интенсивности определяет сложности, возникающие при оценке физиологической регенерации. В старом организме скорость протекания клеточной и внутриклеточной регенерации снижается по сравнению со зрелым организмом [2, 3, 4]. В то же время известно, что регенерация печени существенно активируется после ее резекции. В настоящем исследовании изучение регенераторных процессов в печени зрелых и старых животных осуществлялось в условиях ее резекции. В качестве дополнительного фактора, активирующего регенерацию печени, была использована аллогенная трансплантация плацентарных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК). Выбор этих клеток был обусловлен их способностью к выработке противовоспалительных факторов, факторов роста (HGF- Hepatocyte growth factor,

It is known that the liver under physiological conditions has a low cell renewal rate [1]. The presence of several methods of liver regeneration (cellular and intracellular), as well as their low level of intensity determines the difficulties encountered in assessing physiological regeneration. In the old body, the rate of cellular and intracellular regeneration decreases in comparison with a mature organism [2, 3, 4]. At the same time, it is known that liver regeneration is significantly activated after its resection. In the present study, the study of regenerative processes in the liver of mature and old animals was carried out under conditions of its resection. As an additional factor activating liver regeneration, allogeneic transplantation of placental multipotent mesenchymal stromal cells (MMSC) was used. The choice of these cells was due to their ability to produce anti-inflammatory factors, growth factors (HGF-Hepatocyte growth factor, VEGF - Vascular endothelial growth factor), matrix metalloproteinases [5, 6, 7, 8, 9]. The immunosuppressive properties of MMSCs determined the possibility of

VEGF — Vascular endothelial growth factor), матричных металлопротеиназ [5, 6, 7, 8, 9]. Иммуносупрессивные свойства ММСК определили возможность проведения аллогенной трансплантации данных видов клеток [10].

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на 84 белых зрелых лабораторных мышах-самцах возраста 7-8 месяцев, массой 20-23 г. и 84 старых лабораторных мышах-самцах возраста 16-17 месяцев, массой 27-30 г. Производилось выделение культуры ММСК из хориона плаценты 5 лабораторных животных мышей-самок возраста 3-4 месяца, срок гестации 18 дней. 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 №2 от 16.02.2018.

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 полученной культуры в направлениях, характерных для ММСК — в адипоцитарном и остеогенном. Жизнеспособность клеток была определена с помощью суправитальной окраски раствором трипанового синего и перед трансплантацией составила 95-97%. Для трансплантации лабораторным животным были использованы ММСК третьего пассажа в дозе 4 млн клеток/кг.

Резекция 2/3 печени у лабораторных мышей выполнена по методике С. Mitchell и Н. Willenbring [11]. Введение клеток производили в хвостовую вену через 1 час после выполнения резекции. Исследовалось влияние ММСК на морфометрические показатели печени и биохимические показатели периферической крови в физиологических условиях и после субтотальной резекции на 1, 3, 7 сутки. Из опыта животных выводили декапитацией под легким эфирным наркозом.

Были выделены опытная и контрольная подгруппы лабораторных животных. Опытной подгруппе животных проводили трансплантацию ММСК в дозе 4 млн клеток/кг, контрольной подгруппе вводили раствор NaCl 0,2 мл.

allogeneic transplantation of these cell types [10].

Materials and methods

The experiments were performed on 84 mature white laboratory male mice aged 7-8 months, weighing 20-23 g and 84 old laboratory male mice aged 16-17 months, weighing 27-30 g. An MMSC culture was isolated from 5 laboratory placenta chorion animal female mice 3-4 months old; gestational age 18 days. 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. Cell viability was determined using supravital staining with trypan blue solution and before transplantation was 95-97%. MMSCs of the third passage were used for transplantation to laboratory animals at a dose of 4 million cells/kg.

Resection of 2/3 of the liver in laboratory mice was performed according to the method of С. Mitchell and Н. Willenbring [11]. Cells were introduced into the tail vein 1 hour after resection. We studied the effect of MMSCs on the morphometric parameters of the liver and biochemical parameters of peripheral blood under physiological conditions and after subtotal resection on days 1, 3, 7. From the experience of the animals was removed by decapitation under mild ether anesthesia.

Experimental and control subgroups of laboratory animals were isolated. The experimental subgroup of animals was transplanted MMSC at a dose of 4 million cells/kg 0.2 ml NaCl solution was administered to the control subgroup.

Preparation of liver tissue samples for histological examination was carried out on an automatic processor Leica EG 1160 (Leica, Germany), followed by pouring it into paraffin. Histological sections of the liver with a thickness of 3-5 μ m were 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

Подготовку образцов ткани печени для гистологического исследования осуществляли на автоматическом процессоре Leica EG 1160 (Leica, 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). С этой целью производили микрофотографию 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 (‰). 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.

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 Бергтола), глюкоза (реакция Триндера), общий билирубин (Метод Йендрашека-Грофа), аспаратаминотрансфераза (АСТ), аланинаминотрансфераза (АЛТ), щелочная фосфатаза (ЩФ). При определении биохимических показателей использовались наборы компании «Ольвекс Диагностикум», Россия.

Достоверность отличий в сравниваемых выборках проведено 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 зрелых и старых лабораторных животных на 1, 3, 7 сутки после введения ММСК лабораторным животным без резекции печени.

На 1 сутки после резекции печени, так же как в фи-

(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 count 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. 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 calculated hepatocytes.

The assessment of biochemical parameters of peripheral blood was performed on an automatic biochemical and enzyme immunoassay chem Well 2910 (Combi). The following biochemical parameters were studied: total protein, albumin, urea, glucose, total bilirubin, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase. In determining the biochemical parameters used sets of the company «Olvex Diagnostikum», Russia.

The reliability 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 result

In the analysis of biochemical parameters of peripheral blood and morphometric parameters of the liver of mature and old laboratory animals on 1, 3, 7 days after the introduction of MMSC to laboratory animals without liver resection.

At 1 day after liver resection, as well as in physiological conditions, both age groups showed no effect from allogeneic transplantation of placental MMSCs.

On the 3rd day after liver resection against the background of MMSC administration in mature laboratory animals, a decrease in AST by 24.1%, ALT by 24.8%, and alkaline phosphatase by 23.1% was revealed in comparison with the data of the control subgroup (table 1).

Analyzing biochemical indices of peripheral blood of mature and old laboratory animals on day 7 after liver resection on the background of the introduction of ITCS decreased level of enzymes AST, ALT, alkaline phosphatase compared with control subgroups. An increase in fibrinogen levels was also found in both age groups studied. In mature laboratory animals, the urea level increased by 21.9% compared to the data of the control subgroup of mature laboratory animals (table 2).

When studying the morphometric parameters of the liver on 1 and 3 days after liver resection on the background of the introduction of MSCS, no differences were found between the experimental and control subgroups in both

зиологических условиях, в обеих возрастных группах отмечено отсутствие эффекта от аллогенной трансплантации плацентарных ММСК.

Таблица 1

Биохимические показатели периферической крови лабораторных мышей на 3 сутки после резекции печени

| Показатели | Значение | | | |
|---------------------------|--------------|---------------|--------------|--------------|
| | Зрелые | | Старые | |
| | NaCl | ММСК | NaCl | ММСК |
| Общий белок, г/л | 50,03±4,82 | 55,61±4,24 | 47,76±4,48 | 55,34±5,09 |
| Альбумин, г/л | 19,80±2,51 | 21,60±3,14 | 18,11±2,36 | 18,87±2,51 |
| Мочевина, ммоль/л | 4,37±0,33 | 4,59±0,36 | 4,49±0,39 | 4,60±0,51 |
| Глюкоза, ммоль/л | 3,66±0,29 | 4,20±0,46 | 4,13±0,72 | 4,40±0,34 |
| Общий билирубин, мкмоль/л | 21,99±5,47 | 21,29±2,36 | 25,89±2,27 | 24,20±2,06 |
| АСТ, Ед/л | 209,53±13,85 | 158,99±14,38* | 212,14±19,08 | 24,20±2,06 |
| АЛТ, Ед/л | 155,24±9,38 | 116,73±12,51* | 211,50±18,06 | 203,93±19,32 |
| Щелочная фосфатаза, Ед/л | 106,67±10,45 | 82,0±7,26* | 130,37±25,94 | 200,39±18,59 |
| Фибриноген, г/л | 2,0±0,17 | 2,11±0,18 | 2,27±0,26 | 2,49±0,24 |

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

Таблица 2

Биохимические показатели периферической крови лабораторных мышей на 7 сутки после резекции печени

| Показатели | Значение | | | |
|---------------------------|--------------|---------------|--------------|---------------|
| | Зрелые | | Старые | |
| | NaCl | ММСК | NaCl | ММСК |
| Общий белок, г/л | 44,27±3,62 | 49,63±2,80 | 47,63±3,77 | 52,77±3,85 |
| Альбумин, г/л | 20,59±1,90 | 23,13±2,32 | 18,13±1,42 | 20,19±2,16 |
| Мочевина, ммоль/л | 4,57±0,46 | 5,57±0,48* | 4,54±0,35 | 4,97±0,23 |
| Глюкоза, ммоль/л | 4,30±0,29 | 4,91±0,51 | 4,26±0,39 | 4,53±0,37 |
| Общий билирубин, мкмоль/л | 15,41±2,76 | 14,81±2,02 | 17,14±2,21 | 16,34±1,84 |
| АСТ, Ед/л | 153,86±16,96 | 103,57±12,42* | 183,59±16,79 | 123,8±9,29° |
| АЛТ, Ед/л | 137,10±16,29 | 86,34±7,52* | 175,01±12,82 | 127,34±10,12° |
| Щелочная фосфатаза, Ед/л | 83,11±5,93 | 64,23±6,00* | 114,89±9,67 | 90,50±6,51° |
| Фибриноген, г/л | 2,20±0,20 | 2,76±0,15* | 2,44±0,16 | 3,03±0,20° |

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

На 3 сутки после резекции печени на фоне введения ММСК у зрелых лабораторных животных выявлено

age groups.

Table 1

Biochemical parameters of blood of laboratory mice on the 3th day after liver resection,

| Parameters | Value | | | |
|------------------------------------|--------------|---------------|--------------|--------------|
| | Mature | | Old | |
| | NaCl | MMSC | NaCl | MMSC |
| Total protein, g/l | 50.03±4.82 | 55.61±4.24 | 47.76±4.48 | 55.34±5.09 |
| Albumin, g/l | 19.80±2.51 | 21.60±3.14 | 18.11±2.36 | 18.87±2.51 |
| Urea, mmol/l | 4.37±0.33 | 4.59±0.36 | 4.49±0.39 | 4.60±0.51 |
| Glucose, mmol/l | 3.66±0.29 | 4.20±0.46 | 4.13±0.72 | 4.40±0.34 |
| Total bilirubin, $\mu\text{mol/l}$ | 21.99±5.47 | 21.29±2.36 | 25.89±2.27 | 24.20±2.06 |
| AST, U/l | 209.53±13.85 | 158.99±14.38* | 212.14±19.08 | 24.20±2.06 |
| ALT, U/l | 155.24±9.38 | 116.73±12.51* | 211.50±18.06 | 203.93±19.32 |
| alkaline phosphatase U/l | 106.67±10.45 | 82.0±7.26* | 130.37±25.94 | 200.39±18.59 |
| /fibrinogen, g/l | 2.0±0.17 | 2.11±0.18 | 2.27±0.26 | 2.49±0.24 |

Note: * — unlike the control subgroup of mature laboratory animals, significantly with $p < 0.05$.

Table 2

Biochemical parameters of blood of laboratory mice on the 7th day after liver resection,

| Parameters | Value | | | |
|------------------------------------|--------------|---------------|--------------|---------------|
| | Mature | | Old | |
| | NaCl | MMSC | NaCl | MMSC |
| Total protein, g/l | 44.27±3.62 | 49.63±2.80 | 47.63±3.77 | 52.77±3.85 |
| Albumin, g/l | 20.59±1.90 | 23.13±2.32 | 18.13±1.42 | 20.19±2.16 |
| Urea, mmol/l | 4.57±0.46 | 5.57±0.48* | 4.54±0.35 | 4.97±0.23 |
| Glucose, mmol/l | 4.30±0.29 | 4.91±0.51 | 4.26±0.39 | 4.53±0.37 |
| Total bilirubin, $\mu\text{mol/l}$ | 15.41±2.76 | 14.81±2.02 | 17.14±2.21 | 16.34±1.84 |
| AST, U/l | 153.86±16.96 | 103.57±12.42* | 183.59±16.79 | 123.8±9.29° |
| ALT, U/l | 137.10±16.29 | 86.34±7.52* | 175.01±12.82 | 127.34±10.12° |
| alkaline phosphatase U/l | 83.11±5.93 | 64.23±6.00* | 114.89±9.67 | 90.50±6.51° |
| fibrinogen, g/l | 2.20±0.20 | 2.76±0.15* | 2.44±0.16 | 3.03±0.20° |

Note: * — unlike the control subgroup of mature laboratory animals, reliably with $p < 0.05$; ° — unlike the control subgroup of old laboratory animals, reliably with $p < 0.05$

When analyzing the morphometric parameters of mature laboratory mice on day 7 after liver resection, the experimental group showed an increase in the number of mitotic index by 27.7%, a decrease in apoptotic index by 24.3%, which led to an increase in the number of

снижение показателей АСТ на 24,1%, АЛТ на 24,8%, щелочной фосфатазы на 23,1% по сравнению с данными контрольной подгруппы (таблица 1).

Анализируя биохимические показатели периферической крови зрелых и старых лабораторных животных на 7 сутки после резекции печени на фоне введения ММСК отмечено снижение уровня ферментов АСТ, АЛТ, щелочной фосфатазы по сравнению с данными контрольной подгруппы. Также обнаружено повышение уровня фибриногена в обеих изучаемых возрастных группах. У зрелых лабораторных животных отмечено повышение уровня мочевины на 21,9% по сравнению с данными контрольной подгруппы зрелых лабораторных животных (таблица 2).

Таблица 3
Морфометрические показатели печени лабораторных мышей на 7 сутки после резекции печени, $M \pm m$, $n=7$

| Показатели | Значение | | | |
|--|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Зрелые | | Старые | |
| | NaCl | ММСК | NaCl | ММСК |
| Количество гепатоцитов на 1 мм ² | 1918,29± 82,04 | 2394,14± 225,8* | 1552,00± 101,14 | 1591,43± 102,08 |
| Площадь гепатоцитов, мкм ² | 286,41± 22,44 | 275,14± 24,16 | 348,19± 28,36 | 352,31± 33,73 |
| Площадь ядра гепатоцитов, мкм ² | 63,39± 5,12 | 76,63± 4,92* | 72,77± 10,32 | 87,93± 8,91° |
| Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм ² | 223,03± 17,97 | 204,37± 22,80 | 227,13± 15,37 | 224,73± 19,86 |
| Ядерно-цитоплазматическое отношение | 0,29±0,02 | 0,38±0,02* | 0,32±0,02 | 0,39±0,01° |
| Количество двуядерных гепатоцитов на мм ² | 320,77± 10,64 | 393,90± 23,23* | 305,74± 22,52 | 379,71± 35,33° |
| Митотический индекс | 4,51±0,47 | 5,76±0,49* | 1,50±0,10 | 1,57±0,12 |
| Апоптотический индекс | 1,25±0,09 | 0,94±0,07* | 1,81±0,17 | 1,42±0,12° |
| Фибриноген, г/л | 2,20±0,20 | 2,76±0,15* | 2,44±0,16 | 3,03±0,20° |

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

При изучении морфометрических показателей печени на 1 и 3 сутки после резекции печени на фоне введения ММСК не обнаружено отличий между опытной и контрольной подгруппами в обеих возрастных группах.

При анализе морфометрических показателей зрелых лабораторных мышей на 7 сутки после резекции печени в опытной группе отмечено увеличение количества МИ на 27,7%, снижение АИ на 24,3%, что привело к повышению количества гепатоцитов на 24,8%. В то же время у старых лабораторных животных выявля-

hepatocytes by 24.8%. At the same time, in old laboratory animals, only an increase in apoptotic index was detected without an increase in mitotic index and the total number of hepatocytes.

Also, in mature and old laboratory animals, an increase in the area of the hepatocyte nucleus was observed, which led to an increase in nuclear-cytoplasmic ratio. In laboratory animals of both age groups, an increase in the number of binuclear hepatocytes was observed (table 3).

Table 3
Morphometric parameters of the liver of laboratory mice on the 7th day after liver resection, $M \pm m$, $n=7$

| Parameters | Value | | | |
|---|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Mature | | Old | |
| | NaCl | MMSC | NaCl | MMSC |
| Number of hepatocytes per 1 mm ² | 1918.29± 82.04 | 2394.14± 225.8* | 1552.00± 101.14 | 1591.43± 102.08 |
| Hepatocyte area, μm ² | 286.41± 22.44 | 275.14± 24.16 | 348.19± 28.36 | 352.31± 33.73 |
| The area of nucleus of hepatocytes, μm ² | 63.39± 5.12 | 76.63± 4.92* | 72.77± 10.32 | 87.93± 8.91° |
| The area of the cytoplasm of hepatocytes, μm ² | 223.03± 17.97 | 204.37± 22.80 | 227.13± 15.37 | 224.73± 19.86 |
| Nuclear-cytoplasmic ratio | 0.29±0.02 | 0.38±0.02* | 0.32±0.02 | 0.39±0.01° |
| Number of binuclear hepatocytes per mm ² | 320.77± 10.64 | 393.90± 23.23* | 305.74± 22.52 | 379.71± 35.33° |
| Mitotic index, ‰ | 4.51±0.47 | 5.76±0.49* | 1.50±0.10 | 1.57±0.12 |
| Apoptotic index, ‰ | 1.25±0.09 | 0.94±0.07* | 1.81±0.17 | 1.42±0.12° |
| Фибриноген, г/л | 2,20±0,20 | 2,76±0,15* | 2,44±0,16 | 3,03±0,20° |

Note: * unlike the control subgroup of Mature laboratory animals, reliably with $p < 0.05$; ° unlike the control subgroup of old laboratory animals, reliably with $p < 0.05$.

Conclusion

The conducted research indicates the possibility of MMSC in mature and old body to restore the morphofunctional state of the liver after its Subtotal resection. This is evidenced by changes in the biochemical parameters of peripheral blood — a decrease in the increased activity of enzymes (AST, ALT, alkaline phosphatase). At the same time, in mature animals, the correction of these indicators against the background of placental MSCS transplantation is noted already on the 3rd day after liver resection, whereas in older animals this effect was detected on the 7th day. Also, against the background of the introduction of MMSC after liver resection, morphometric changes were revealed, indicating the activation of liver regeneration. However, the mechanisms of activation of regeneration in a mature and old body have some differences. In mature laboratory animals, the restoration of the organ structure

но лишь повышение АИ без увеличения МИ и общего количества гепатоцитов.

Также у зрелых и старых лабораторных животных отмечено увеличение площади ядра гепатоцитов, что привело к возрастанию ЯЦИ. У лабораторных животных обеих возрастных групп отмечено увеличение количества двуядерных гепатоцитов (таблица 3).

Заключение

Проведенные исследования свидетельствуют о возможности ММСК в зрелом и старом организме восстанавливать морфофункциональное состояние печени после ее субтотальной резекции. Об этом свидетельствуют изменения биохимических показателей периферической крови — снижение повышенной активности ферментов (АСТ, АЛТ, щелочной фосфатазы). При этом у зрелых животных коррекция данных показателей на фоне трансплантации плацентарных ММСК отмечается уже на 3 сутки после резекции печени, тогда как у старых животных этот эффект выявлен на 7 сутки. Также на фоне введения ММСК после резекции печени выявлены морфометрические изменения, свидетельствующие об активации регенерации печени. Однако механизмы активации регенерации в зрелом и старом организме имеют некоторые отличия. У зрелых лабораторных животных восстановление структуры органа достигается за счет механизмов клеточной (увеличение количества гепатоцитов) и внутриклеточной регенерации (увеличение размеров ядра, ЯЦИ), в то время как у старых лабораторных животных за счет внутриклеточной регенерации.

is achieved due to the mechanisms of cellular (increase in the number of hepatocytes) and intracellular regeneration (increase in the size of the nucleus, nuclear-cytoplasmic ratio), while in older laboratory animals due to intracellular regeneration.

ЛИТЕРАТУРА

1. Michalopoulos G.K. Liver regeneration. *J. Cell Physiol.* – 2007. – V. 213, № 2. – P. 286–300.
2. Shinichiro O., Shinichi M. Potentials of Regenerative Medicine for Liver Disease. *Surg. Today.* – 2009. – Vol.39. P.1019–1025.
3. Timchenko N.A. Aging and liver regeneration. *Trends in Endocrinology & Metabolism.* –2009. –№4, Vol.20. – P. 171–176.
4. Сазонов С.В. Т-лимфоциты регуляторы активности пролиферации клеток в ткани (научный обзор). *Вестник Уральской медицинской академической науки.* 2007. № 1. С. 91–94.
5. 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.
6. 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].
7. Ikebe C., Suzuki K. Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Therapy: Optimization of Cell Preparation Protocols. *Biomed Research International.* 2014. P.951512.

REFERENCES

1. Michalopoulos G.K. Liver regeneration. *J. Cell Physiol.* – 2007. – V. 213, № 2. – P. 286–300.
2. Shinichiro O., Shinichi M. Potentials of Regenerative Medicine for Liver Disease. *Surg. Today.* – 2009. – Vol.39. pp. 1019–1025.
3. Timchenko N.A. Aging and liver regeneration. *Trends in Endocrinology & Metabolism.* –2009. –№4, Vol.20. – P. 171–176.
4. Sazonov S.V. T-lymphocytes regulators of cell proliferation activity in tissue (scientific review). *Vestnik Ural'skoj medicinskoj akademicheskoy nauki.* 2007. № 1. pp. 91–94. {In Russ.}
5. Maklakova I.Yu., Grebnev D.Yu., 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. No. 4. pp. 82–86. {In Russ.}
6. 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].
7. Ikebe C., Suzuki K. Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Therapy: Optimization of Cell Preparation Protocols. *Biomed Research International.* 2014. P.951512.

8. 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.
9. Prockop D.J., Oh J.Y. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation. *Mol. Ther.* – 2012. – Vol. 20(1) – pp. 14-20.
10. 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.
11. 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.

8. 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. pp. 987-96.
9. Prockop D.J., Oh J.Y. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation. *Mol. Ther.* – 2012. – Vol. 20(1) – pp. 14-20.
10. Wang Y, Chen X, Cao W, Shi Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat Immunol* 2014. Vol. 15. pp. 1009–1016.
11. Mitchell C., Willenbring H. A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice. *Nature protocols*. Vol.3. №7.2008. pp. 1167-1171. doi: 10.1038/nprot.2014.122.

Авторы

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

Маклакова Ирина Юрьевна
ФГБОУ ВО 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
ФГБОУ ВО 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

Базарный Владимир Викторович
ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет
Доктор медицинских наук, профессор кафедры клини-

Authors

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

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-bazarnyi@yandex.ru

Ilya V. Gavrilov
Ural State Medical University
Cand. Sci. (Bio.), Associate Professor
3 Repin str. Yekaterinburg Russian Federation 620028

ческой лабораторной диагностики и бактериологии
Российская Федерация, 620028 г. Екатеринбург, ул. Ре-
пина 3
vlad-bazarny@yandex.ru

Institute of Medical Cell Technologies
Senior researcher
22a Karl Marx str. Yekaterinburg Russian Federation
620026
given18@yandex.ru

Гаврилов Илья Валерьевич
ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский
университет
Кандидат биологических наук. доцент кафедры биохимии
Российская Федерация, 620028 г. Екатеринбург, ул. Ре-
пина 3
ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных техноло-
гий»
Старший научный сотрудник
Российская Федерация, 620026 г. Екатеринбург, ул.
Карла Маркса 22а
given18@yandex.ru