

УДК 616-092.9

И.Ю. Маклакова^{1,2}, В.В. Базарный¹, Д.Ю. Гребнев^{1,2}

ВЛИЯНИЕ СОЧЕТАННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ И ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА РЕГЕНЕРАЦИЮ ПЕЧЕНИ ПОСЛЕ ЕЕ РЕЗЕКЦИИ У СТАРЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

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

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

Резюме. *Целью данного исследования* стало изучение изменений морфофункционального состояния печени старых лабораторных животных после ее резекции на фоне сочетанной трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных и гемопоэтических стволовых клеток. **Материалы и методы.** Исследования выполнены на старых лабораторных животных мышах-самцах возраста 16-17 мес. Производилась резекция 2/3 печени у старых лабораторных мышей по методике С. Mitchell и Н. Willenbring. Через 1 час после субтотальной резекции проводилась сочетанная трансплантация двух видов клеток: мультипотентных мезенхимальных стромальных (в дозе 4 млн. клеток/кг) и гемопоэтических стволовых клеток (в дозе 330 тыс. клеток/кг). Эксперименты по получению культуры ММСК и ГСК выполнены из хориона плаценты 10 лабораторных мышей-самок возраста 3–4 месяца, массой 20–25 г, срок гестации 18 дней. Оценка регенерации печени осуществлялась на 1, 3, 7 сутки после резекции печени путем анализа морфометрических показателей печени и биохимических показателей периферической крови. **Результаты.** Проведенные исследования показали активацию у старых животных белоксинтетической функции печени, снижение уровня ферментов цитолиза, повышение активности клеточной (увеличение количества гепатоцитов) и внутриклеточной (повышение площади ядра гепатоцитов, количества двоядерных клеток) регенерации печени после ее резекции на фоне введения стволовых клеток.

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

Конфликт интересов отсутствует.

Контактная информация автора, ответственного за переписку:

Гребнев Дмитрий Юрьевич

dr-grebnev77@mail.ru

Дата поступления 10.01.2020 г.

Образец цитирования:

Маклакова И.Ю., Базарный В.В., Гребнев Д.Ю. Влияние сочетанной трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных и гемопоэтических стволовых клеток на регенерацию печени после ее резекции у старых лабораторных животных. Вестник уральской медицинской академической науки. 2020, Том 17, №2, с. 139–148, DOI: 10.22138/2500-0918-2020-17-2-139-148

Известно, что при старении происходит снижение количества стволовых клеток в организме, снижение их чувствительности к факторам роста. При этом качественный и количественный состав клеток является определяющим в восстановлении структуры и функции ткани, органа [1]. В настоящем исследовании изучается возможность использования сочетанной трансплантации двух видов стволовых клеток: плацентарных мультипотентных мезенхимальных стромальных (ММСК) и гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) для активации регенерации резецированной печени у старых лабораторных животных. Выбор именно этих видов клеток был обусловлен их биологическими особенностями. Известно, что ММСК способны вырабатывать хемоаттрактант для ГСК — SDF-1 (stromal derived factor 1), который способствует усилению хоуминга трансплантированных и аутологичных ГСК в поврежденную ткань [2, 3, 4]. ГСК способны активировать регенерацию печени путем слияния с гепатоцитами (fusion effect) [5]. Выработка ММСК иммуносупрессивных факторов (трансформирующий фактор роста, ИЛ10) исключает возможность развития иммунологических конфликтов [6, 7]. Известно, что при старении способность печени к регенерации существенно снижается. Регенерация печени при старении имеет свои особенности. Это проявляется и в скорости регенерации, и в механизмах ее реализации [8, 9]. В старом организме регенерация печени реализу-

ется преимущественно на внутриклеточном уровне [10, 11]. Указанное выше определило дизайн данного исследования. В настоящем исследовании получены данные по изменению биохимических показателей периферической крови, морфометрических показателей печени после сочетанной трансплантации ММСК и ГСК старым лабораторным животным с резекцией печени.

Материалы и методы

Исследования выполнены на 84 старых лабораторных животных мышах-самцах возраста 16–17 мес, массой 27–30 г. Эксперименты по получению культуры ММСК и ГСК выполнены из хориона плаценты 10 лабораторных животных мышей-самок возраста 3–4 месяца, массой 20–25 г, срок гестации 18 дней. Животные содержались в стандартных условиях лабораторного вивария, предусмотренных «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденных Приказом МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г. и Приказом МЗ СССР № 1179 от

10.10.1983 «Об утверждении нормативов затрат кормов для лабораторных животных в учреждениях здравоохранения». Манипуляции с экспериментальными животными выполнялись в соответствии с положениями Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным, методическими рекомендациями по выведению из опыта и эвтаназии.

Имунофенотип ММСК характеризуется: CD115+, Sca1+, CD29+, CD45- [10]. Имунофенотипирование суспензии ММСК было проведено методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител, конъюгированных с флуорохромами (Becton Dickinson, США). Во фракции трансплантируемых клеток оценивалось содержание ММСК с иммунофенотипом положительных по CD105, CD29, Sca-1 и отрицательных по CD45 на проточном цитометре Beckman Coulter Navios с помощью набора Mouse Mesenchymal Stem Cell Multi-Color Flow Cytometry Kit (Bio-Techne, США). Количество жизнеспособных клеток с фенотипом CD45-CD105+Sca1+CD29+ составило 93,5% (рисунок 1).

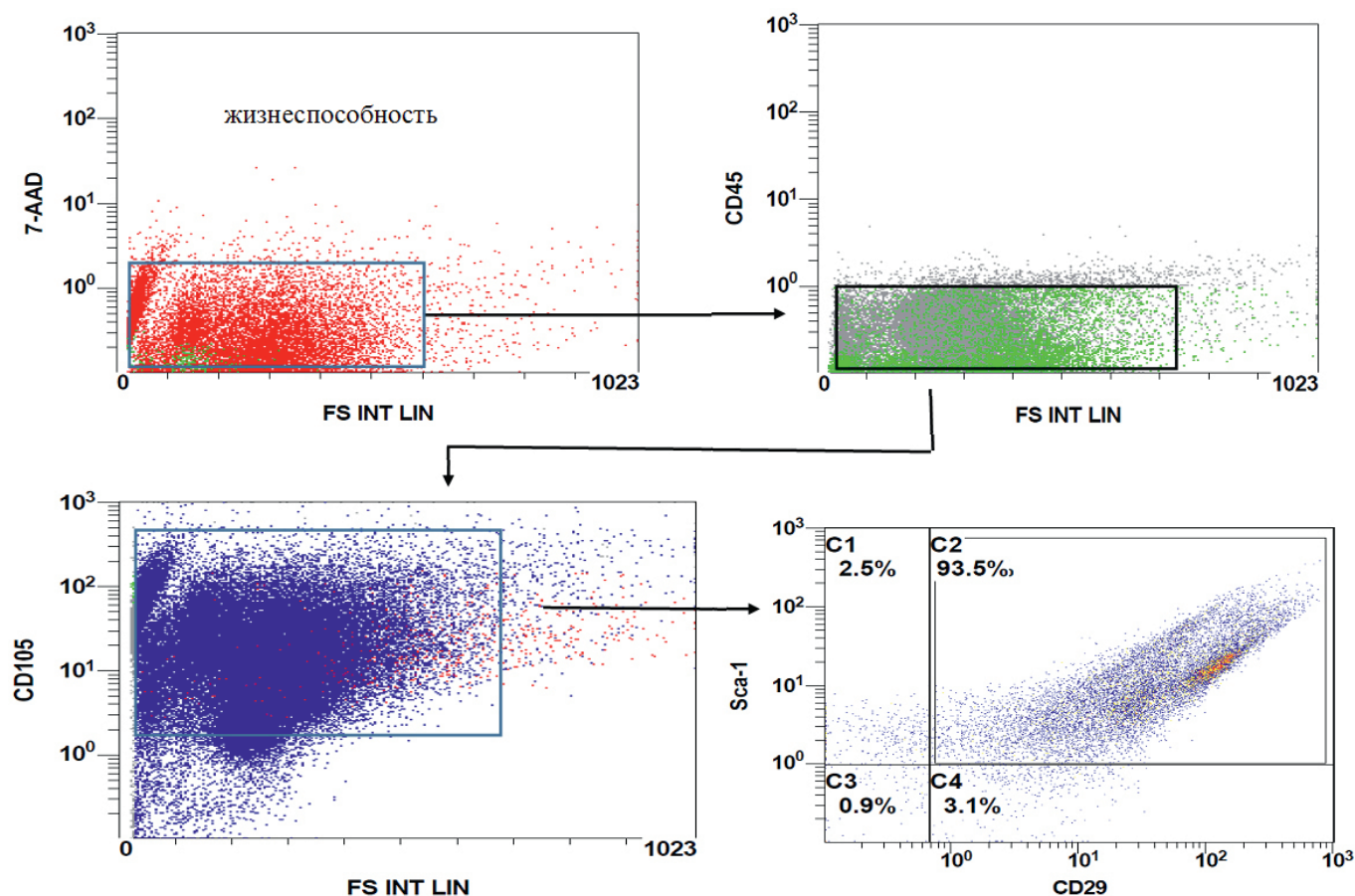


Рисунок 1. Идентификация ММСК методом проточной цитофлуориметрии

Имунофенотип ГСК мыши характеризуется: Sca1+, CD38+, CD117+, Lin-, CD34-. 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 отрицатель-

ных по Lin- (CD45, C3e, Ly-6G, M1/70, Ter-119). Содержание клеток после иммуномагнитной сепарации с иммунофенотипом CD117+, Sca-1+, Lin- составило 90-96% (рисунок 2).

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 [12].

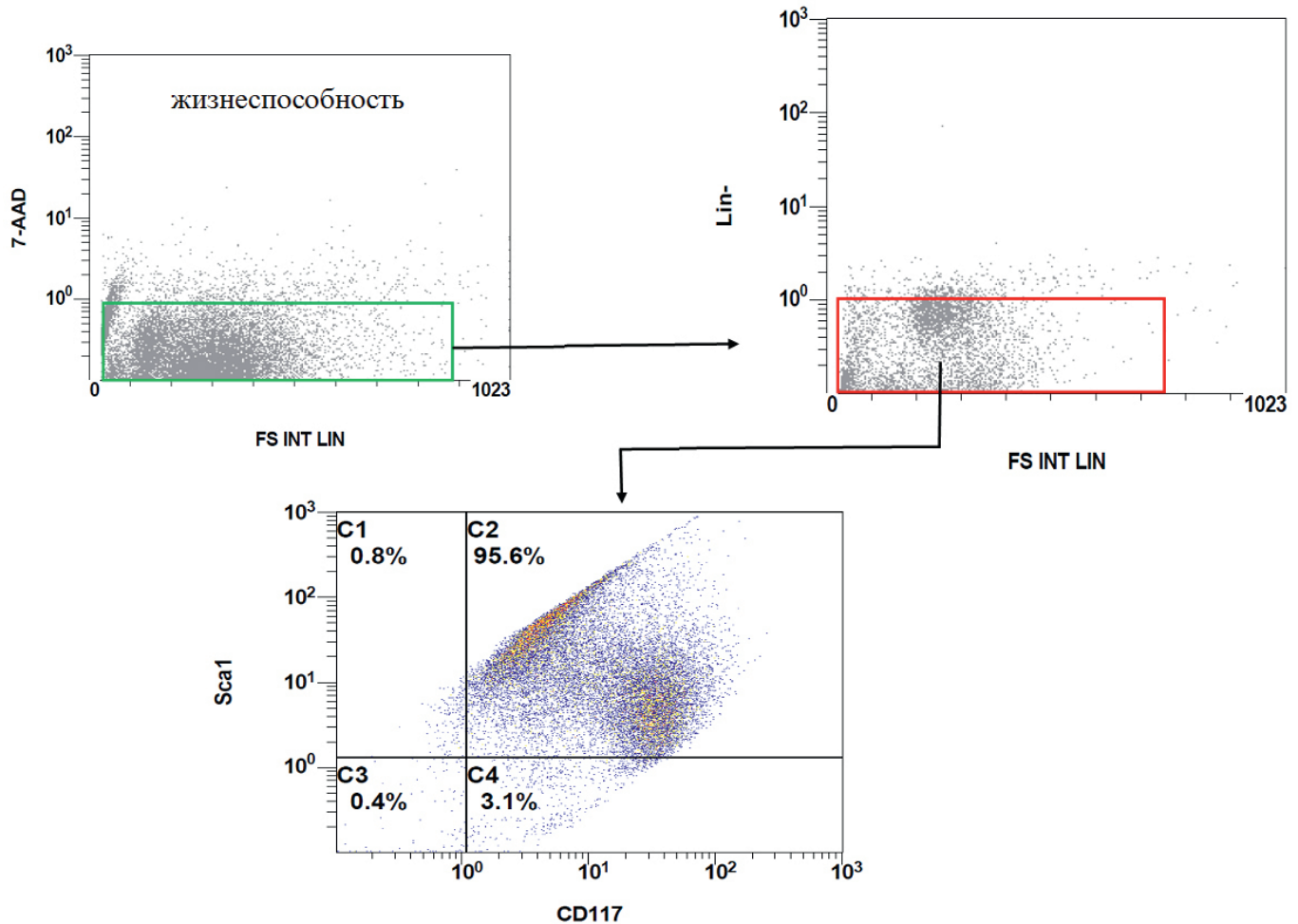


Рисунок 2. Идентификация ГСК методом проточной цитофлуорометрии

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 двуядерных гепатоцитов на 1 мм², 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 Apop Tag® 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 Бертлопта), 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 старых лабораторных животных на 1, 3, 7 сутки после сочетанной трансплантации ММСК и ГСК достоверных различий с интактной группой не обнаружено. Также на 1 и 3 сутки после резекции печени на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК не выявлено отличий в биохимических показателях периферической крови от данных контрольной группы.

Анализируя биохимические показатели периферической крови старых лабораторных животных на 7 сутки после резекции печени на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК отмечено повышение содержания общего белка на 22,9%, альбумина на 21,4%, мочевины на 23,6%. Также выявлено снижение уровня показателей цитолиза гепатоцитов: АСТ на 21%, АЛТ на 24,5%, щелочной фосфатазы на 20,4% по сравнению с данными контрольной группы. Также выявлено повышение уровня фибриногена на 23,8% (таблица 1).

Таблица 1

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

Показатели	Значение		
	Интактные животные	NaCl (контрольная группа)	ММСК+ГСК (опытная группа)
Общий белок, г/л	73,39±4,42	47,63±3,77*	58,53±3,20* **
Альбумин, г/л	26,76±2,21	18,13±1,42*	22,01±2,41* **
Мочевина, ммоль/л	6,20±0,43	4,54±0,35*	5,61±0,36**
Глюкоза, ммоль/л	5,93±0,36	4,26±0,39*	4,69±0,27*
Общий билирубин, мкмоль/л	10,07±0,46	17,14±2,21*	16,34±1,84*
АСТ, Ед/л	102,73±7,83	183,59±16,79*	144,34±12,92* **
АЛТ, Ед/л	92,87±7,19	175,01±12,82*	132,17±9,49* **
Щел. Фосфатаза, Ед/л	78,61±5,82	114,89±9,67*	91,46±6,82* **
Фибриноген, г/л	3,80±0,23	2,44±0,16*	2,99±0,16* **

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

Анализируя морфометрические показатели печени на 1 сутки после резекции печени у старых лабораторных животных на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК не обнаружено достоверных отличий между опытной и контрольной группами. На 3 сутки после резекции печени на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК обнаружено снижение апоптотического индекса на 20,8% (таблица 2).

Таблица 2

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

Показатели	Значение		
	Интактные животные	NaCl (контрольная группа)	ММСК+ГСК (опытная группа)
Количество гепатоцитов на 1 мм ²	1323,14±82,73	1814,29±137,96*	1860,43±142,37*
Площадь гепатоцитов, мкм ²	297,10±20,77	379,31±32,58*	372,47±32,68*
Площадь ядра гепатоцитов, мкм ²	57,60±3,97	76,01±8,56*	81,66±7,36*
Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм ²	239,5±24,74	261,57±24,08	390,81±25,82
ЯЦИ	0,25±0,04	0,29±0,01*	0,28±0,02*
Количество двуядерных гепатоцитов на мм ²	241,06±7,61	343,43±25,8*	361,0±30,57*
МИ, ‰	0,40±0,05	2,81±0,27*	2,98±0,39*
АИ, ‰	0,51±0,04	2,29±0,20*	1,81±0,15* **

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

При анализе морфометрических показателей старых лабораторных мышей на 7 сутки после резекции печени на фоне введения ММСК и ГСК в опытной группе отмечено повышение количества гепатоцитов на 21,3%, повышение площади ядра гепатоцитов на 35,7%, возрастание ядерно-цитоплазматического индекса (ЯЦИ) на 20,4%, увеличение количества двуядерных клеток на 28,1%. Также выявлено понижение апоптотического индекса на 20,4% (таблица 3).

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют, что старые лабораторные животные отвечают на проведенную сочетанную трансплантацию ММСК и ГСК активацией белоксинтетической функции, снижением активности ферментов цитолиза. Оценивая данные морфометрических исследований, следует отметить, что в старом организме на фоне трансплантации стволовых клеток происходит снижение запрограммированной клеточной гибели, активация механизмов клеточной (увеличение содержания гепатоцитов) и внутриклеточной (повышение количества двуядерных клеток, увеличение ядра гепатоцитов) регенерации.

Таблица 3

Морфометрические показатели печени старых лабораторных мышей на 7 сутки после резекции печени на фоне введения ММСК и ГСК, М±m, n=7

Показатели	Значение		
	Интактные животные	NaCl (контрольная группа)	ММСК+ГСК (опытная группа)
Количество гепатоцитов на 1 мм ²	1323,14±82,73	1552,0±101,14*	1883,29±90,61**
Площадь гепатоцитов, мкм ²	297,10±20,77	348,19±28,36*	355,71±20,53*
Площадь ядра гепатоцитов, мкм ²	57,60±3,97	72,77±10,32*	98,77±9,25* **
Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм ²	239,5±24,74	227,13±15,37	256,94±11,28
ЯЦИ	0,25±0,04	0,32±0,02*	0,38±0,02* **
Количество двухядерных гепатоцитов на мм ²	241,06±7,61	305,74±22,52*	391,73±31,97**
МИ, %	0,40±0,05	1,50±0,10*	1,54±0,13*
АИ, %	0,51±0,04	1,81±0,17*	1,44±0,10* **

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

ЛИТЕРАТУРА

- Schmucker D.L., Sanchez H. Liver Regeneration and Aging: A Current Perspective // Hindawi Publishing Corporation Current Gerontology and Geriatrics Research Volume 2011, Article ID 526379, 8 pages doi:10.1155/2011/526379
- 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.
- 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.
- 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.
- Best J., Manka P., Wing-Kin Syn, Dollé L. at all. Role of liver progenitors in liver regeneration // Vol 4, No 1 (February 2015): Hepatobiliary Surgery and Nutrition (Special Focus on Liver Immunology: Part II)
- Солоницина Л.А., Сазонов С.В. Анализ проекта закона «О биомедицинских клеточных продуктах» // Гены и клетки. 2015. 10. Т. 3. С. 120-121
- 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.

- Michalopoulos G.K. Liver regeneration // J. Cell Physiol. – 2007. – V. 213, № 2. – P. 286–300.
- Timchenko N.A. Aging and liver regeneration // Trends in Endocrinology & Metabolism. 2009. №4. Vol.20.
- Сазонов С.В., Бриллиант А.А., Бриллиант Ю.В. Связь состояния пролиферативных процессов и особенностей рецепторного аппарата опухолевых клеток карциномы молочной железы // Гены и клетки. 2017. 12. Т.4. С. 76-81
- Nucci R. A. B., Teodoro A. C. S., Gama, E. F. Liver regeneration and aging: a review // Morphol. Sci. 2016. vol. 33. №. 4. P. 179-182
- 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. P. 171–176.

Авторы

Маклакова Ирина Юрьевна

ФГБОУ ВО УГМУ Министерства здравоохранения РФ
Кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической физиологии

ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»

Старший научный сотрудник

Российская Федерация, 620028 г. Екатеринбург, ул. Репина 3

makliu@mail.ru

Базарный Владимир Викторович

ФГБОУ ВО УГМУ Министерства здравоохранения РФ
Доктор медицинских наук, профессор кафедры клинической лабораторной диагностики и бактериологии
Российская Федерация, 620028 г. Екатеринбург, ул. Репина 3

vlad-bazarny@yandex.ru

Гребнев Дмитрий Юрьевич

ФГБОУ ВО УГМУ Министерства здравоохранения РФ
Доктор медицинских наук, заведующий кафедрой патологической физиологии

ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»

Старший научный сотрудник

Российская Федерация, 620028 г. Екатеринбург, ул. Репина 3

dr-grebnev77@mail.ru

I.Yu. Maklakova^{1,2}, V.V. Bazarniy¹, D.Yu. Grebnev^{1,2}

EFFECT OF COMBINED TRANSPLANTATION OF MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL AND HEMATOPOIETIC STEM CELLS ON LIVER REGENERATION AFTER LIVER RESECTION IN OLD LABORATORY ANIMALS

¹Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation;

²Institute of Medical Cell Technologies, Yekaterinburg, Russian Federation

Abstract. *The aim of this study* was to study the changes in the morphological and functional state of the liver of old laboratory animals after its resection against the background of combined transplantation of multipotentmesenchymal stromal and hematopoietic stem cells.

Materials and methods. The studies were performed on old laboratory animals, male mice of the age of 16-17 months. Resection of 2/3 of the liver was performed in old laboratory mice according to the method of C. Mitchell and H. Willenbring. One hour after subtotal resection, a combined transplantation of two types of cells was performed: multipotentmesenchymal stromal cells (at a dose of 4 million cells / kg) and hematopoietic stem cells (at a dose of 330 thousand cells / kg). The experiments on obtaining the MMSC and HSC culture were performed from the placenta chorion of 10 laboratory female mice 3-4 months old, weighing 20-25 g, gestational age 18 days. Assessment of liver regeneration was carried out on days 1, 3, 7 after resection of the liver by analyzing morphometric parameters of the liver and biochemical parameters of peripheral blood.

Results. Studies have shown the activation of protein synthesizing liver function in old animals, a decrease in the level of cytolysis enzymes, an increase in the activity of cellular regeneration (increase in the hepatocyte nucleus area, the number of binuclear cells) of liver regeneration after resection against the introduction of stem cells.

Keywords: liver resection, multipotentmesenchymal stromal cells, hematopoietic stem cells, liver regeneration, aging

It is known that with aging there is a decrease in the number of stem cells in the body, a decrease in their sensitivity to growth factors. At the same time, the qualitative and quantitative composition of cells is crucial in restoring the structure and function of tissue and organ [1]. This study explores the possibility of using combined transplantation of two types of stem cells: placental multipotentmesenchymal stromal (MMSC) and hematopoietic stem cells (HSC) to activate the regeneration of the resected liver in old laboratory animals. The choice of these types of cells was due to their biological characteristics. It is known that MMSCs are capable of producing a chemoattractant for HSCs - SDF-1 (stromal derived factor 1), which enhances the homing of transplanted and autologous HSCs into damaged tissue [2, 3, 4]. HSCs are able to activate liver regeneration by fusion with hepatocytes (fusion effect) [5]. The development of MMSC immunosuppressive factors (transforming growth factor, IL10) excludes the possibility of developing immunological conflicts [6, 7]. It is known that with aging, the ability of the liver to regenerate is significantly reduced. Regeneration of the liver during aging has its own characteristics. This is manifested both in the rate of regeneration and in the mechanisms of its implementation [8, 9]. In the old body, liver regeneration is realized mainly at the intracellular level [10, 11]. The above determined the design of this study. In this study, we obtained data on the change in the biochemical parameters of peripheral blood, morphometric parameters of the liver after combined transplantation of MMSCs and HSCs with old laboratory animals with liver resection.

Materials and methods

The studies were performed on 84 old laboratory animals, male mice aged 16-17 months, weighing 27-30 g. Experiments on the production of MMSC and HSC cultures were performed from the placenta chorion of 10 laboratory animals of female mice 3-4 months old, weighing 20–25 g, gestational age 18 days. The animals were kept in standard laboratory vivarium conditions provided for by the «Rules for the Use of Experimental Animals», approved by Order of the Ministry of Health of the USSR No. 755 of 08/12/1977 and Order of the Ministry of Health of the USSR No. 1179 of 10/10/1983 «On Approving the Norms of Cost of Feed for Laboratory Animals in healthcare facilities». Manipulations with

There is no conflict of interest.

Contact details of the corresponding author:

Dmitry Yu. Grebnev

dr-grebnev77@mail.ru

Received 10.01.2020

For citation:

Maklakova I.Yu., Bazarniy V.V., Grebnev D.Yu. Effect of combined transplantation of multipotent mesenchymal stromal and hematopoietic stem cells on liver regeneration after liver resection in old laboratory animals. Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki. = Journal of Ural Medical Academic Science. 2020, Vol. 17, no. 2, pp. 139–148. DOI: 10.22138/2500-0918-2020-17-2-139-148 (In Russ)

experimental animals were carried out in accordance with the provisions of the Helsinki Declaration on the Humane Treatment of Animals, guidelines for deducing from experience and euthanasia.

The immunophenotype of MMSC is characterized by: CD115 +, Sca1 +, CD29 +, CD45- [10]. Immunophenotyping of the MMSC suspension was carried out by flow cytometry using monoclonal antibodies conjugated with fluorochromes (Becton Dickinson, USA).

The content of MMSCs with immunophenotype positive for CD105, CD29, Sca-1 and negative for CD45 on a Beckman Coulter Navios flow cytometer using the Mouse Mesenchymal Stem Cell Multi-Color Flow Cytometry Kit (Bio-Techne, United States) was evaluated in the fraction of transplanted cells. The number of viable cells with the phenotype CD45-CD105 + Sca1 + CD29 + was 93.5% (Figure 1).

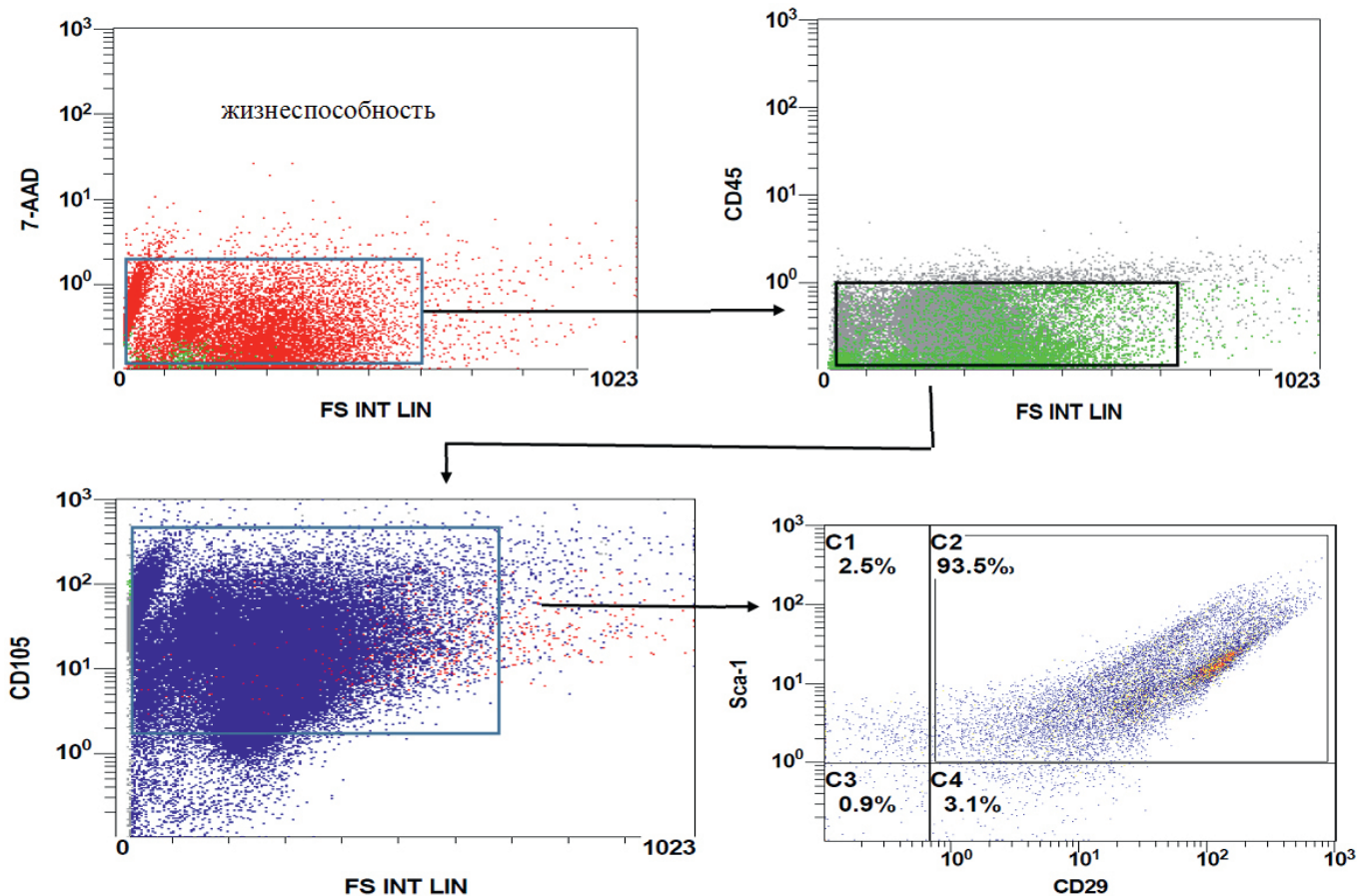


Figure 1. MMSC identification by flow cytometry

The mouse HSC immunophenotype is characterized by: Sca1+, CD38+, CD117+, Lin-, CD34-. 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- amounted to 90-96% (Figure 2).

MMSC and HSC were injected intravenously into the animals of the experimental group, respectively, at a dose of 4 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 C. Mitchell and H. Willenbring [12].

The following morphometric indicators of the liver

were evaluated: hepatocyte count per 1 mm², hepatocyte area, hepatocyte core area, hepatocyte cytoplasm area = hepatocyte area - hepatocyte core area, nuclear cytoplasmic index (NRC), number of binuclear hepatocytes per 1 mm², 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).

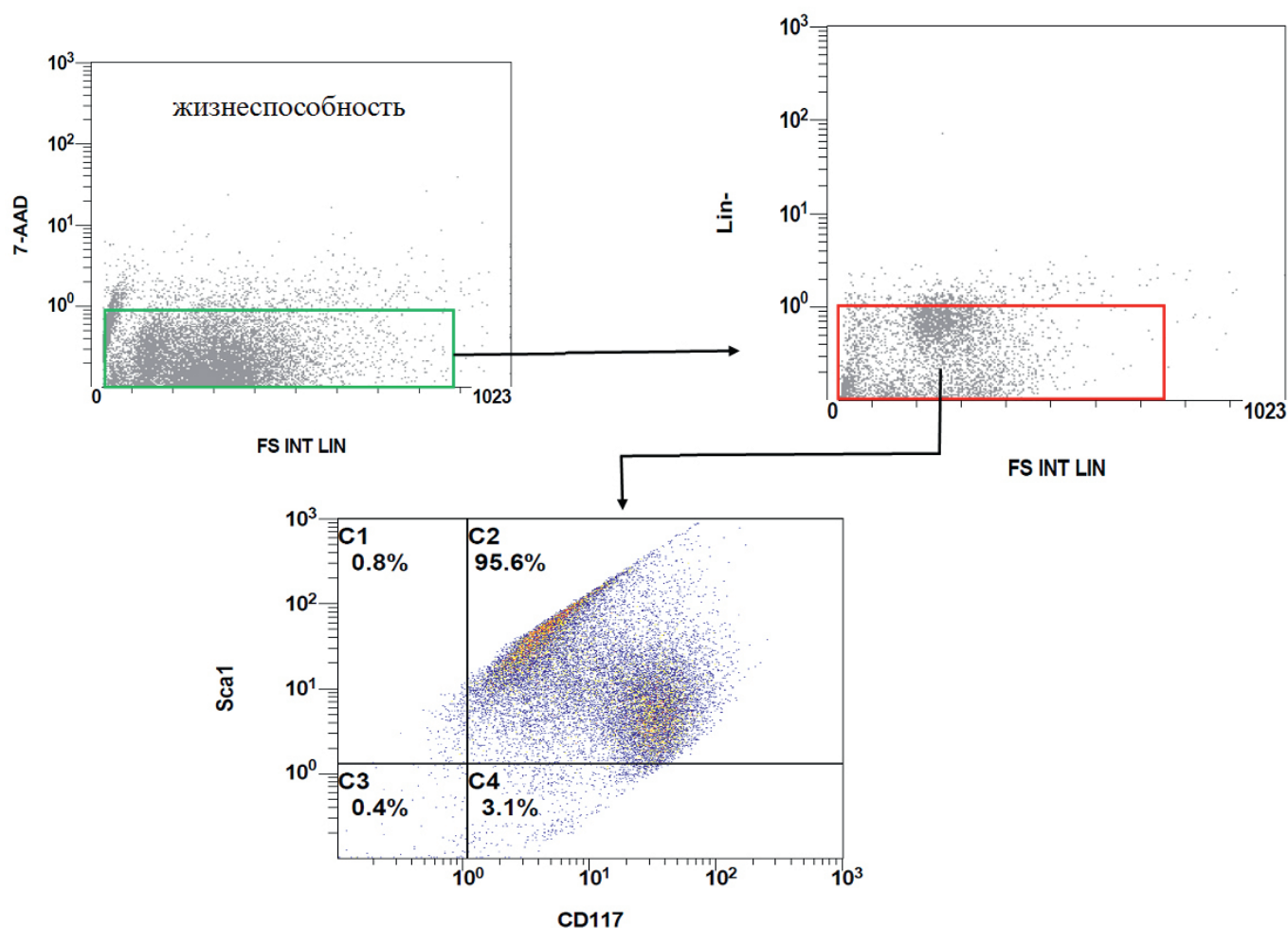


Figure 2. HSC identification by flow cytometry

Research results

When analyzing biochemical indices of peripheral blood and morphometric indices of the liver of old laboratory animals on days 1, 3, and 7 after the combined transplantation of MMSCs and HSCs, no significant differences were found with the intact group. Also, on days 1 and 3 after liver resection against the background of combined transplantation of MMSCs and HSCs, there were no differences in the biochemical parameters of peripheral blood from the control group.

Analyzing the biochemical parameters of the peripheral blood of old laboratory animals on the 7th day after liver resection, combined with transplantation of MMSCs and HSCs, an increase in the total protein content by 22.9%, albumin by 21.4%, urea by 23.6% was noted. A decrease in the level of hepatocyte cytolysis indicators was also revealed: AST by 21%, ALT by 24.5%, alkaline phosphatase by 20.4% compared with the control group. An increase in fibrinogen level by 23.8% was also revealed

(table 1).

Analyzing morphometric parameters of the liver on the 1st day after liver resection in old laboratory animals on the background of combined transplantation of MMSCs and HSCs, no significant differences were found between the experimental and control groups. On the 3rd day after liver resection against the background of combined transplantation of MMSCs and HSCs, a decrease in the apoptotic index by 20.8% was found (table 2).

When analyzing the morphometric parameters of old laboratory mice on the 7th day after liver resection against the background of the administration of MMSCs and HSCs, the experimental group showed an increase in the number of hepatocytes by 21.3%, an increase in the area of the hepatocyte nucleus by 35.7%, an increase in the nuclear cytoplasmic index (NRC) by 20.4%, an increase in the number of binuclear cells by 28.1%. Also revealed a decrease in the apoptotic index by 20.4% (table 3).

Table 1

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

Parameters	Value		
	Intact animals	NaCl (control group)	MMSC+ HSC (experience dgroup)
Totalprotein, g/l	73,39±4,42	47,63±3,77*	58,53±3,20* **
Albumin, g/l	26,76±2,21	18,13±1,42*	22,01±2,41* **
Urea, mmol/l	6,20±0,43	4,54±0,35*	5,61±0,36**
Glucose, mmol/l	5,93±0,36	4,26±0,39*	4,69±0,27*
Total bilirubin, $\mu\text{mol/l}$	10,07±0,46	17,14±2,21*	16,34±1,84*
AST, U/l	102,73±7,83	183,59±16,79*	144,34±12,92* **
ALT, U/l	92,87±7,19	175,01±12,82*	132,17±9,49* **
Alkalinephosphatase U/l	78,61±5,82	114,89±9,67*	91,46±6,82* **
Fibrinogen, g/l	3,80±0,23	2,44±0,16*	2,99±0,16* **

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

Table 2

Morphometric indicators of the liver of old 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		
	Intact animals	NaCl (control group)	MMSC+ HSC (experienced group)
Number of hepatocytes per 1 mm^2	1323,14±82,73	1814,29±137,96*	1860,43±142,37*
Hepatocyte area, μm^2	297,10±20,77	379,31±32,58*	372,47±32,68*
The area of nucleus of hepatocytes, μm^2	57,60±3,97	76,01±8,56*	81,66±7,36*
The area of the cytoplasm of hepatocytes, μm^2	239,5±24,74	261,57±24,08	390,81±25,82
Nuclear-cytoplasmic ratio	0,25±0,04	0,29±0,01*	0,28±0,02*
Number of binuclear hepatocytes per mm^2	241,06±7,61	343,43±25,8*	361,0±30,57*
Mitotic index, ‰	0,40±0,05	2,81±0,27*	2,98±0,39*
Apoptotic index, ‰	0,51±0,04	2,29±0,20*	1,81±0,15* **

Note: * the difference from the intact group of old laboratory animals, significantly with $p < 0.05$.

Table 3

Morphometric parameters of the liver of old 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		
	Intact animals	Intact animals	Intact animals
Number of hepatocytes per 1 mm^2	1323,14±82,73	1552,0±101,14*	1883,29±90,61* **
Hepatocyte area, μm^2	297,10±20,77	348,19±28,36*	355,71±20,53*
The area of nucleus of hepatocytes, μm^2	57,60±3,97	72,77±10,32*	98,77±9,25* **
The area of the cytoplasm of hepatocytes, μm^2	239,5±24,74	227,13±15,37	256,94±11,28
Nuclear-cytoplasmic ratio	0,25±0,04	0,32±0,02*	0,38±0,02* **
Number of binuclear hepatocytes per mm^2	241,06±7,61	305,74±22,52*	391,73±31,97* **
Mitotic index, ‰	0,40±0,05	1,50±0,10*	1,54±0,13*
Apoptotic index, ‰	0,51±0,04	1,81±0,17*	1,44±0,10* **

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

Conclusion

Thus, the conducted studies indicate that old laboratory animals respond to the combined transplantation of MMSC and HSC by activation of the protein synthesizing function, and a decrease in the activity of cytolysis enzymes. Assessing the data of morphometric studies, it should be noted that in the old organism, against the background of stem cell transplantation, there is a decrease in programmed cell death, activation of cellular mechanisms (increase in the number of hepatocytes) and intracellular (increase in the number of binuclear cells, increase in the nucleus of hepatocytes) regeneration.

REFERENCES

1. Schmucker D.L., Sanchez H. Liver Regeneration and Aging: A Current Perspective. Hindawi Publishing Corporation Current Gerontology and Geriatrics Research Volume 2011, Article ID 526379, 8 pages doi:10.1155/2011/526379
2. Maklakova I.Y., Grebnev D.Yu., Yastrebov A.P. The influence of extreme factors on the homing of multipotent mesenchymal stromal cells. 2015. V. 59. No. 4. pp. 82-86 (in Russ).
3. 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, No. 1. pp. 61-64.
4. 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.
5. Best J., Manka P., Wing-Kin Syn, Dollé L. et al. Role of liver progenitors in liver regeneration. Vol 4, No 1 (February 2015): Hepatobiliary Surgery and Nutrition (Special Focus on Liver Immunology: Part II)
6. Solonichina L.A., Sazonov S.V. Analysis of the draft law "On Biomedical Cellular Products". Genyikletki. 2015. 10. V. 3. pp. 120-121 (in Russ).
7. 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.
8. Michalopoulos G.K. Liver regeneration. J. Cell Physiol. – 2007. – V. 213, No. 2. – pp. 286–300.
9. Timchenko N.A. Aging and liver regeneration. Trends in Endocrinology & Metabolism. 2009. No. 4. Vol. 20.
10. Sazonov S.V., Brilliant A.A., Brilliant Yu.V. The relationship between the state of proliferative processes and the characteristics of the receptor apparatus of tumor cells of breast carcinoma. Genyikletki. 2017. 12. V.4. pp. 76-81 (in Russ).
11. Nucci R. A. B., Teodoro A. C. S., Gama, E. F. Liver regeneration and aging: a review. Morphol. Sci. 2016. vol. 33. no. 4. pp. 179-182.
12. Mitchell C., Willenbring H. A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice. Nature protocols. Vol. 3. No. 7. 2008. pp. 1167-1171. pp. 171–176.

Authors

Irina Y. Maklakova
Ural State Medical University
Cand. Sci. (Med.), Associate Professor of the Department of pathological physiology,
Senior researcher at the Institute of Medical Cell Technologies
3 Repin str. Yekaterinburg, Russian Federation, 620028
makliu@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

Dmitry Y. Grebnev
Ural State Medical University
Dr. Sci. (Med.), Head of the Department of pathological physiology, Senior researcher at the Institute of Medical Cell Technologies
3 Repin str. Yekaterinburg, Russian Federation, 620028
dr-grebnev77@mail.ru