

DOI: 10.15825/1995-1191-2019-3-100-110

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РЕГЕНЕРАТОРНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА И ОБЩЕЙ РНК, ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ НИХ, ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ФИБРОЗИРУЮЩЕМ ПОВРЕЖДЕНИИ ПЕЧЕНИ

*З.З. Гоникова, А.О. Никольская, Л.А. Кирсанова, М.Ю. Шагидулин, Н.А. Онищенко, В.И. Севастьянов*

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

**Цель работы** – провести сравнительную оценку эффективности восстановительных процессов в печени после моделировании хронического фиброзирующего повреждения печени (ХФПП) при использовании мононуклеарных клеток костного мозга (ККМ) и общей РНК (оРНК) из ККМ. **Материалы и методы.** В работе использовано 140 крыс породы Вистар. На 100 крысах моделировали ХФПП, из которых 25 погибло. Выжившие 75 крыс (ХФПП сформировался к 3-му месяцу) были разделены на 3 группы: группа 1 – контроль (введение физиологического раствора); группа 2 – однократное введение оРНК из ККМ в дозе 30 мкг/100 г веса; группа 3 – однократное введение ККМ в дозе  $(30-35) \times 10^6$  клеток. Динамику восстановительных процессов в печени оценивали по летальности животных, а также по динамике восстановления биохимических показателей (АлАТ, АсАТ, ЩФ и общий белок) и морфологической картины печени на 7-е сутки и через 3, 6 и 9 месяцев. Достоверность различия сравниваемых величин оценивали по критерию t Стьюдента при  $p < 0,05$ . **Результаты.** Летальность животных с ХФПП в группе 1 составила 12%, в группах 2 и 3 – по 4%; В группе 1 АлАТ и АсАТ восстанавливались до значений нормы через 2 мес., ЩФ – через 3 мес., а общий белок оставался сниженным более 4 мес. В группах 2 и 3 все показатели печеночного гомеостаза возвращались к значениям до моделирования ХФПП быстрее, чем в группе 1 (через 2 мес.), но в группе 2 скорость восстановления была выше, чем в группе 3. Показано, что нормализация функциональных показателей печени во всех группах опережала восстановление ее гистологической структуры. Активизация процессов дефиброзирования печени в группе 2 наступала через 3 мес., а в группах 1 и 3 – через 6 мес. Восстановление гистологической структуры печени в группе 2 происходило через 6 мес., а в группах 1 и 3 – через 9 мес. **Заключение.** ККМ и оРНК из ККМ в биологически эффективных дозах способствуют активизации восстановительных процессов в печени при ХФПП, однако регуляторное воздействие от применения оРНК проявляется раньше и является более эффективным.

*Ключевые слова:* хроническая печеночная недостаточность, цирроз печени, клетки костного мозга, общая РНК, регенерация печени.

## COMPARATIVE ANALYSIS OF REGENERATIVE ACTIVITY OF BONE MARROW CELLS AND TOTAL RNA ISOLATED FROM THEM AT CHRONIC FIBROTIC LIVER DAMAGE

*Z.Z. Gonikova, A.O. Nikolskaya, L.A. Kirsanova, M.Yu. Shagidulin, N.A. Onishchenko, V.I. Sevastyanov*

V.I. Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

**Aim:** to carry out a comparative assessment of the effectiveness of recovery processes in the liver after modeling of chronic fibrotic liver damage (CFLD) at using of bone marrow mononuclear cells (BMNC) and total RNA

**Для корреспонденции:** Гоникова Залина Залимгериевна. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел. (966) 188-33-33. E-mail: zalina3392@gmail.com

**For correspondence:** Gonikova Zalina Zalimgerievna. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation. Tel. (966) 188-33-33. E-mail: zalina3393@gmail.com

(tRNA), isolated from BMMC. **Materials and methods.** In this study it was used 140 rats of Wistar breed. CFLD was modeled on 100 rats, of which 25 died. The surviving 75 rats (CFLD formed by 3 months) were divided into 3 groups: group 1 – control (administration of saline solution); group 2 – single administration of tRNA from BMMC at a dose of 30 µg/100 g weight; group 3 – single administration of BMMC at a dose of  $(30-35) \times 10^6$  cells. The dynamics of recovery processes in the liver was evaluated by the mortality of animals, as well as by the dynamics of the recovery of biochemical parameters (AlAT, AsAT, ALP and total protein) and morphological status of the liver in 7 days and in 3, 6 and 9 months. The reliability of differences between compared values was evaluated by the t – Student criterion at  $p < 0.05$ . **Results.** The mortality of animals with CFLD in group 1 was 12%, in groups 2 and 3 by 4%; In group 1 – AlAT and AsAT were restored to normal values in 2 months, ALP in 3 months, and the total protein remained reduced for more than 4 months. In groups 2 and 3, all hepatic homeostasis indices returned to the values, which were before CFLD modeling, faster than in group 1 (in 2 months), but in group 2 the recovery rate was higher than in group 3. It was shown that the normalization of liver functional parameters in all groups was ahead of the restoration of its histological structure. The activation of liver defibrotic processes in group 2 occurred in 3 months, and in groups 1 and 3 – in 6 months. The restoration of liver histological structures in group 2 occurred in 6 months, and in groups 1 and 3 – after 9 months. **Conclusion.** BMMC and tRNA from BMMC in biologically effective doses take in part at the activation of liver recovery processes after modeling CFLD, but the regulatory impact of tRNA appears earlier and is more effective.

*Key words: chronic liver failure, liver cirrhosis, bone marrow cells, total RNA, liver regeneration.*

Развитие хронической печеночной недостаточности (ХПН) и формирование цирроза печени является следствием глубокого нарушения в ней процессов восстановительной регенерации, которое создает условия для хронически поддерживаемого воспаления и прогрессирования фиброза [1].

На современном этапе развития медицины решение проблемы необратимого повреждения печени у больных ХПН достигается только путем выполнения таким больным трансплантации донорской печени [2, 3]. Между тем неуклонно возрастающий дефицит донорских органов и продолжающееся увеличение численности пациентов, нуждающихся в трансплантации печени, ограничивает доступность применения этого метода у всех пациентов с конечной стадией ХПН. В сложившихся обстоятельствах возникает необходимость продолжения поиска более доступных и эффективных методов лечения ХПН, основанных на индукции собственных регенерационных резервов печени пациента. Использование стволовых/прогениторных клеток костного мозга (ККМ) стало новой многообещающей стратегией терапии ХПН и цирроза печени.

К настоящему времени уже накоплено достаточное количество клинических и экспериментальных наблюдений, свидетельствующих о позитивном воздействии ККМ гемопоэтического и стромального ряда на структуру и показатели функции печени при ее хроническом фиброзирующем повреждении. Более того, в ряде исследований [4–9] показана даже возможность хотя бы частичного регресса уже сформировавшегося цирроза при трансплантации стволовых/прогениторных ККМ. Однако не все исследователи признают фибролитический эффект ККМ и даже указывают на возможность усиления фиброза при их использовании [10–12].

Констатация диаметрально противоположных результатов от применения стволовых/прогениторных ККМ, по-видимому, является следствием недоучета ряда факторов: типа используемых клеток, их исходного биорегуляторного потенциала (аллогенные клетки здорового донора или аутологичные клетки пациента с ХПН), а также степени обратимости уже имеющихся структурных нарушений в печени, отражением которой является тяжесть сопутствующего иммунного дисбаланса в организме, характеризующаяся развитием иммунодефицита вплоть до иммунного паралича [13, 14]. Отсутствие или кратковременность активации фибролитических процессов в печени при проведении клеточной терапии могут быть обусловлены прежде всего применением аутологичных ККМ пациента, в организме которого уже развился иммунный дисбаланс, ингибирующий функциональную активность восстановленных культивированием и возвращенных в организм ККМ [13]; кроме того, предварительное введение G-CSF, применяемого для восстановления сниженной регуляторной активности клеток КМ пациента [15], также оказывает временный эффект, т. к. ККМ пациента продолжают оставаться под воздействием комплекса иммунопатологических факторов, парализующих их активность. Предсуществующая иммунопатологическая перестройка в организме пациента с ХПН, по-видимому, оказывает свое парализующее воздействие и при использовании аллогенных ККМ.

В последнее десятилетие реализацию регенерационного потенциала ККМ стали связывать с недавно открытым классом многочисленных белок-некодирующих РНК этих клеток: с участием молекул микроРНК, длинных некодирующих РНК, коротких интерферирующих РНК, коротких ядерных РНК и др. [16–25], что послужило основанием для выделения

из ККМ общей РНК и использования ее для индукции восстановительных процессов в самом костном мозге при его повреждении [26–28].

Учитывая, что ХПН, особенно ее терминальная фаза, протекает на фоне иммунного дисбаланса и угнетения регуляторных функций ККМ пациента – неперенных участников регенерационного процесса [14], а также данные о том, что используемые ККМ (аутологичные и аллогенные) быстро утрачивают свое индукционное воздействие на репаративные процессы в организме, мы предположили, что общая РНК из ККМ здорового донора при введении в организм пациента с ХПН будет действовать как биохимический регулятор восстановительных процессов в клетках печени более быстро, более независимо, а потому более эффективно, чем действуют ККМ.

Цель настоящей работы – изучить возможность повышения эффективности восстановительных процессов в печени при ее хроническом токсическом (фиброзирующем) повреждении путем сравнительной оценки регуляторного воздействия мононуклеарных ККМ и общей РНК из ККМ на эти процессы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все исследования с использованием лабораторных животных проводили в строгом соответствии с законодательством Российской Федерации (в соответствии с Правилами лабораторной практики, утвержденными приказом Минздрава России № 708 от 23.08.2010 г, а также стандартом ГОСТ Р ИСО 10993-2-2009 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 2. Требования к условиям содержания животных») и с соблюдением биоэтических принципов, утвержденных Европейской конвенцией о защите позвоночных животных (2005 г.).

Работа выполнена на 140 крысах-самцах породы Вистар весом 250–350 г, у 100 из которых воспроизводили модель хронического фиброзирующего повреждения печени (ХФПП); остальные крысы были использованы для получения мононуклеарных ККМ (ККМ) и для выделения из них общей РНК (оРНК). Модель ХФПП создавали путем хронической затравки животных  $CCl_4$  в сочетании с неполным адьювантом Фрейнда в течение 42 суток по схеме. При моделировании ХФПП погибло 25 животных и к концу затравки выжило 75. Все выжившие крысы после моделирования ХФПП были разделены на 3 группы: группа 1 – контрольная ( $n = 25$ ), с однократным введением физиологического раствора через 7 суток после окончания затравки; группа 2 – опытная ( $n = 25$ ), в которой через 7 суток после моделирования ХФПП внутрибрюшинно однократно вводили оРНК из ККМ здорового животного в дозе 30 мкг/100 г веса животного; группа 3 – опытная ( $n = 25$ ), в которой

через 7 суток после моделирования ХФПП однократно внутрибрюшинно вводили ККМ в дозе  $(30–35) \times 10^6$  клеток на крысу, что сопоставимо с дозой клеток, используемой для выделения и однократного применения оРНК. оРНК из ККМ выделяли методом, разработанным фирмой «Евроген» (Россия), с помощью реактива ExtractRNA, который позволял получать из каждых  $35,0 \times 10^6$  выделенных клеток около  $148,5 \pm 22,3$  мкг оРНК.

Эффективность стимулирующего действия оРНК и ККМ на процессы репаративной регенерации в печени после их введения животным с ХФПП оценивали по летальности животных в 3 исследуемых группах, а также по динамике восстановления печеночного гомеостаза в организме животного и по динамике устранения структурных (фиброзирующих) нарушений в ткани печени на 7-е сутки, а также через 3, 6 и 9 месяцев. Динамику восстановления печеночного гомеостаза в организме оценивали путем измерения в сыворотке крови содержания общего белка и ферментов цитолиза клеток печени: аланиновой аминотрансферазы (АлАТ), аспарагиновой аминотрансферазы (АсАТ) и щелочной фосфатазы (ЩФ).

Различия в структуре ткани печени в контрольной и опытных группах исследовали на одинаковых сроках по степени выраженности фибролитических процессов в соединительной ткани и по количеству молодых новообразованных гепатоцитов в печеночной дольке. Для этого в указанные сроки иссекали печень, готовили из нее гистологические препараты с последующей окраской срезов гематоксилином и эозином и на соединительную ткань по Массону.

Достоверность различия исследуемых показателей в сравниваемых группах оценивали с помощью параметрического критерия  $t$  – Стьюдента, при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Эффективность регуляторного воздействия оРНК и ККМ на восстановительные процессы в печени после моделирования ХФПП оценивали прежде всего по летальности животных. Было констатировано, что в контрольной группе 1 в течение первых 2 месяцев из 25 крыс погибло 3 и это составило 12%; в опытных группах 2 и 3 летальность составила 4% (по одной крысе в каждой группе) в течение всего срока наблюдения. Сравнительное изучение динамики восстановления биохимических показателей функционального состояния печени в 3 исследуемых группах позволило установить их выраженное нарушение сразу после окончания затравки и постепенное восстановление во всех исследуемых группах. Между тем темп восстановления исследуемых показателей в группах был разным (табл. 1–3). В контрольной группе 1 (табл. 1) значения показателей АсАТ и АлАТ

Таблица 1

**Динамика изменения в сыворотке крови крыс общего белка и ферментов цитолиза клеток печени (АлАТ, АсАТ и ЩФ) в группе 1 после моделирования ХФПП и введения физиологического раствора (n = 25)**

**Dynamics of changes in rat serum of total protein and cytolytic enzymes of liver cells (alanine aminotransferase – AlAT, aspartate aminotransferase – AsAT and alkaline phosphatase – ALP) in group 1 after CFLD modeling and infusion of saline (n = 25)**

Сроки после моделирования ХФПП	Группа 1 (контроль), n = 25			
	АсАТ	АлАТ	ЩФ	Белок общий
Исход	58 ± 8	40 ± 6	240 ± 24	98 ± 20
7 суток	282 ± 31*	320 ± 13*	1322 ± 21*	21 ± 16*
1 месяц	196 ± 22*	168 ± 21*	909 ± 31*	26 ± 13*
2 месяца	98 ± 15*	96 ± 14*	532 ± 26*	42 ± 15*
3 месяца	72 ± 14	62 ± 8	426 ± 25*	48 ± 11*
4 месяца	62 ± 10	48 ± 7	250 ± 24	52 ± 6*
6 месяцев	64 ± 15	44 ± 8	240 ± 20	65 ± 7

*Примечание.* \* – p < 0,05 по сравнению с исходным уровнем.

*Note.* \* – p < 0.05 compared with baseline.

Таблица 2

**Динамика изменения в сыворотке крови крыс общего белка и ферментов цитолиза клеток печени (АлАТ, АсАТ и ЩФ) в группе 2 после моделирования ХФПП и введения оРНК (n = 25)**

**Dynamics of changes in rat serum of total protein and cytolytic enzymes of liver cells (AlAT, AsAT and ALP) in group 2 after CFLD modeling and infusion of total RNA (n = 25)**

Сроки после моделирования ХФПП	Опытная группа 2 (оРНК), n = 25			
	АсАТ	АлАТ	ЩФ	Белок общий
Исход	58 ± 8	40 ± 6	240 ± 24	98 ± 20
7 суток	303 ± 20*	278 ± 17*	1187 ± 56*	24 ± 10*
1 месяц	93 ± 15*	88 ± 10*	532 ± 28*	56 ± 10*
2 месяца	68 ± 19	68 ± 15	295 ± 14*	67 ± 14
3 месяца	65 ± 11	62 ± 6	275 ± 15	72 ± 9
4 месяца	62 ± 8	58 ± 12	247 ± 11	86 ± 7
6 месяцев	66 ± 7	44 ± 6	230 ± 14	92 ± 12

*Примечание.* \* – p < 0,05 по сравнению с исходным уровнем.

*Note.* \* – p < 0.05 compared with baseline.

Таблица 3

**Динамика изменения в сыворотке крови крыс общего белка и ферментов цитолиза клеток печени (АлАТ, АсАТ и ЩФ) в группе 3 после моделирования ХФПП и введения мононуклеарных ККМ (n = 25)**

**Dynamics of changes in rat serum of total protein and cytolytic enzymes of liver cells (AlAT, AsAT and ALP) in group 3 after CFLD modeling and injection of BMMC (n = 25)**

Сроки после моделирования ХФПП	Опытная группа 3 (ККМ), n = 25			
	АсАТ	АлАТ	ЩФ	Белок общий
Исход	58 ± 8	40 ± 6	240 ± 24	98 ± 20
7 суток	350 ± 10*	262 ± 27*	1205 ± 47*	36 ± 16*
1 месяц	97 ± 16*	89 ± 16*	570 ± 35*	55 ± 10*
2 месяца	72 ± 15*	70 ± 13*	310 ± 18*	61 ± 8*
3 месяца	64 ± 12	61 ± 10	274 ± 18	68 ± 12
4 месяца	59 ± 12	59 ± 6	252 ± 19	78 ± 8
6 месяцев	62 ± 9	46 ± 11	242 ± 12	88 ± 10

*Примечание.* \* – p < 0,05 по сравнению с исходным уровнем.

*Note.* \* – p < 0.05 compared with baseline.

в сыворотке крови оставались на достоверно более высоком уровне по сравнению с исходными значениями в течение 2 месяцев, ЩФ – в течение 3 месяцев, а содержание общего белка оставалось достоверно сниженным в течение 4 месяцев. В группе 2 с однократным введением оРНК значения АсАТ и АлАТ восстанавливались через 1 месяц, ЩФ – через 2 месяца, а содержание общего белка в сыворотке крови уже через 2 месяца достоверно не отличалось от исходных значений (табл. 2). В группе 3 после однократного введения ККМ все исследуемые показатели оставались достоверно нарушенными по сравнению с исходными значениями в течение 2 месяцев после окончания моделирования ХФПП. Однако при сравнении между собой значений АсАТ, АлАТ, ЩФ и общего белка через 2 месяца после моделирования ХФПП в группах 2 и 3 достоверных различий выявлено не было.

Результаты сравнительного изучения динамики восстановления биохимических показателей, характеризующих функциональное состояние печени после моделирования ХФПП и применения оРНК и ККМ, позволяют нам заключить, что и оРНК, и ККМ способствуют ускоренному восстановлению печеночного гомеостаза в организме, однако эффект от применения оРНК был более выражен.

Из литературы известно, что как в клинике при ХПН, так и в эксперименте при моделировании ХФПП восстановление биохимических показателей печени под воздействием применяемой терапии обычно не сопровождается восстановлением печени на гистологическом уровне, особенно при

ее цирротическом повреждении [29, 30]. Между тем имеющиеся данные о фибролитическом действии стволовых/прогениторных ККМ гемопоэтического и стромального ряда при циррозе печени [4–9] заставили нас изучить в сравнительном аспекте эффективность воздействия оРНК и ККМ в биологически эффективных дозах не только на биохимические, но и на гистологические показатели печени при моделировании ХФПП.

Изучение динамики развития морфологических изменений в печени крыс после моделирования ХФПП показало, что во всех 3 исследуемых группах к 3-му месяцу наблюдений в печени формировался цирроз, однако интенсивность дефиброзирующих процессов в печени по мере увеличения сроков наблюдения была в этих группах разной. Было установлено, что через 1 неделю у всех крыс после окончания затравки в перипортальных зонах печени выявляются выраженные некротические и дистрофические изменения гепатоцитов, а также обнаруживаются нарушения долькового строения паренхимы печени (рис. 1).

Через 3 месяца после окончания затравки и введения физиологического раствора в печени крыс контрольной группы 1 выявляется четкое нарушение балочного строения печеночной ткани и формирование ложных долек; гепатоциты в печени были без выраженных дистрофических изменений, и отмечалась также нерезко выраженная клеточная инфильтрация (рис. 2).

Таким образом, уже к 3-му месяцу после окончания хронической затравки в печени крыс конт-

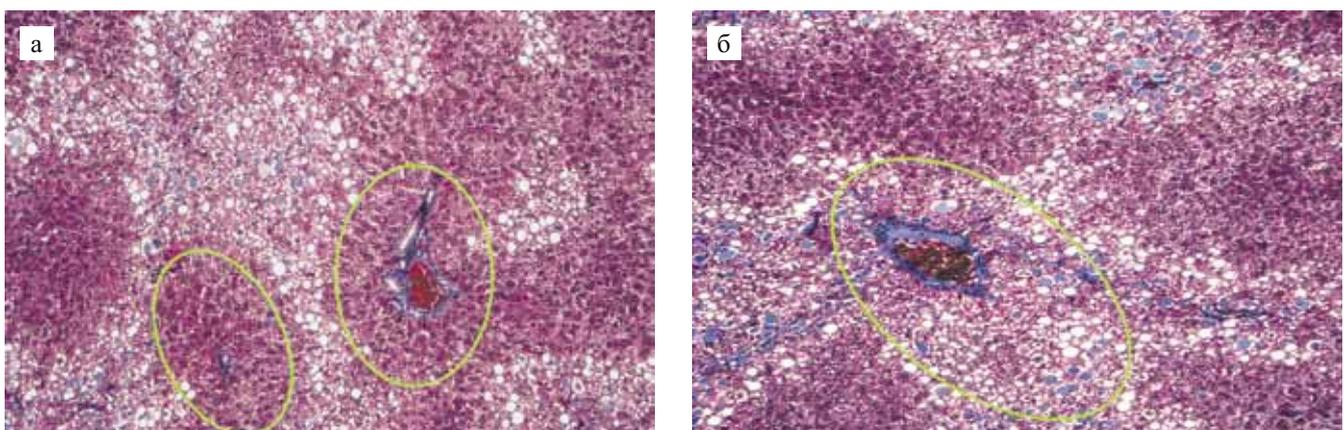


Рис. 1. Гистологическая структура печени крысы через 1 неделю после завершения моделирования ХФПП: а – перипортальная зона с минимально выраженными дистрофическими изменениями гепатоцитов; б – перичесентральная зона с выраженными некротическими и дистрофическими изменениями гепатоцитов (жировая и белковая дистрофия); начало формирования соединительно-тканых септ (обведены овалом). Окраска по Массону.  $\times 100$

Fig. 1. Histological structure of the rat liver in 1 week after completion of CFLD modeling: а – periportal zone with the minimally expressed degenerative changes of hepatocytes; б – pericentral zone with pronounced necrotic and dystrophic changes of hepatocytes (fat and protein dystrophy); the beginning of connective tissue septa formation (marked by an oval). Masson staining.  $\times 100$

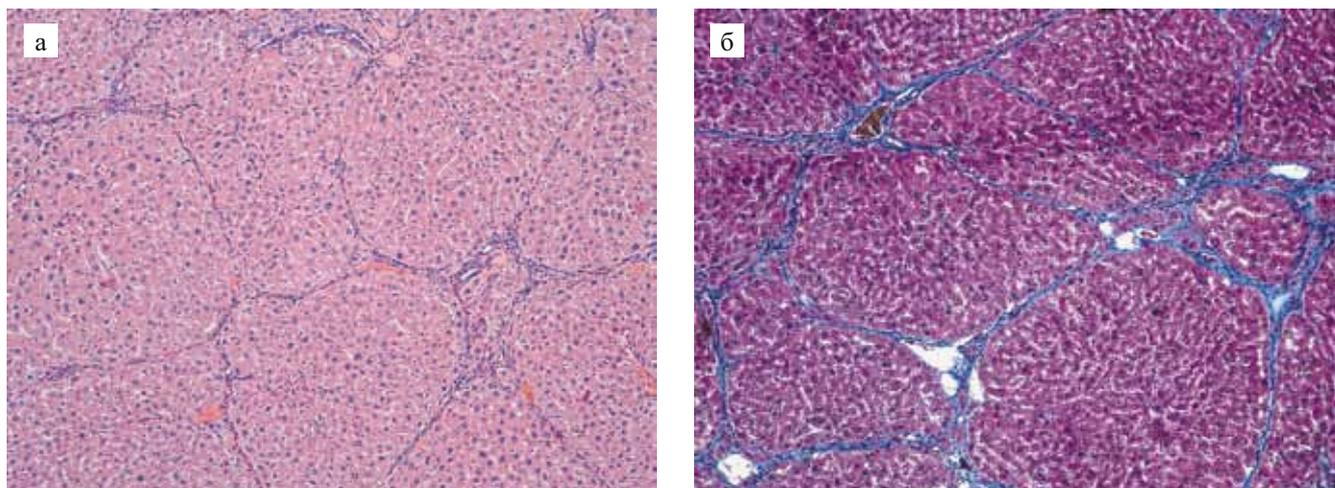


Рис. 2. Гистологическая структура печени крысы через 3 месяца после окончания моделирования ХФПП и введения физиологического раствора. Многочисленные ложные дольки (узлы) паренхимы, ограниченные септами. Сформировавшийся цирроз печени: а – окраска гематоксилин-эозином; б – окраска по Массону.  $\times 100$

Fig. 2. Histological structure of the rat liver in 3 months after completion of CFLD modeling and administration of saline solution. Numerous false lobules (nodes) of parenchyma bounded by septa. The formed liver cirrhosis: a – hematoxylin-eosin staining; б – Masson staining.  $\times 100$

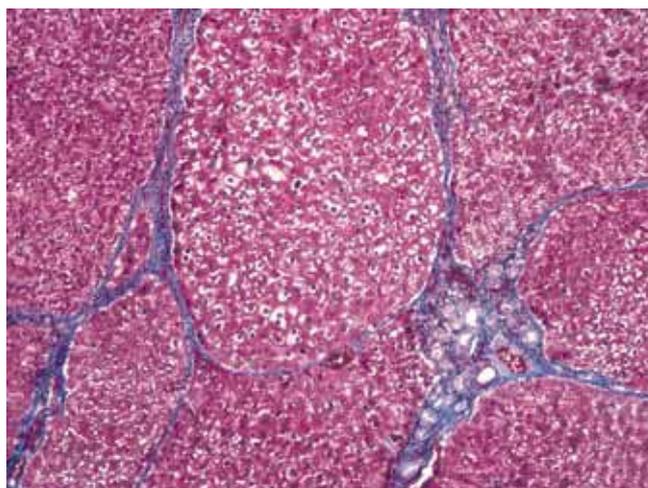


Рис. 3. Гистологическая структура печени крысы через 3 месяца после окончания моделирования ХФПП и введения несортированных мононуклеарных ККМ. Сформированные ложные дольки (узлы) паренхимы, ограниченные септами. Сформировавшийся цирроз печени. Окраска по Массону,  $\times 100$

Fig. 3. Histological structure of the rat liver in 3 months after completion of CFLD modeling and administration of unsorted BMSC. The formed false lobules (nodes) of parenchyma restricted by septa. The formed liver cirrhosis. Masson staining,  $\times 100$

рольной группы 1 формируется гистологическая картина цирроза 3–4-й стадии по классификации Desmet et al., 1994 [31]. Аналогичные результаты структурных нарушений в печени через 3 месяца были получены у крыс опытной группы 3, которым вводили мононуклеарные ККМ (рис. 3).

Между тем у крыс опытной группы 2, которым после окончания затравки однократно вводили оРНК, выделенную из ККМ, на 3-м месяце на фоне сформировавшегося цирроза появляются отчетливые

признаки фибролиза септ образовавшихся ложных долек. Кроме того, в структуре ложных долек выявляются значительные участки молодых новообразованных гепатоцитов (рис. 4). Полученные нами данные свидетельствуют о том, что оРНК к 3-му месяцу тормозит процессы фиброгенеза в печени по сравнению с контролем и опытной группой 3, где процессы фиброобразования остаются отчетливо выраженными. Однако на 3-м месяце в опытной группе 2, так же как в контрольной и в опытной 3-й группах,

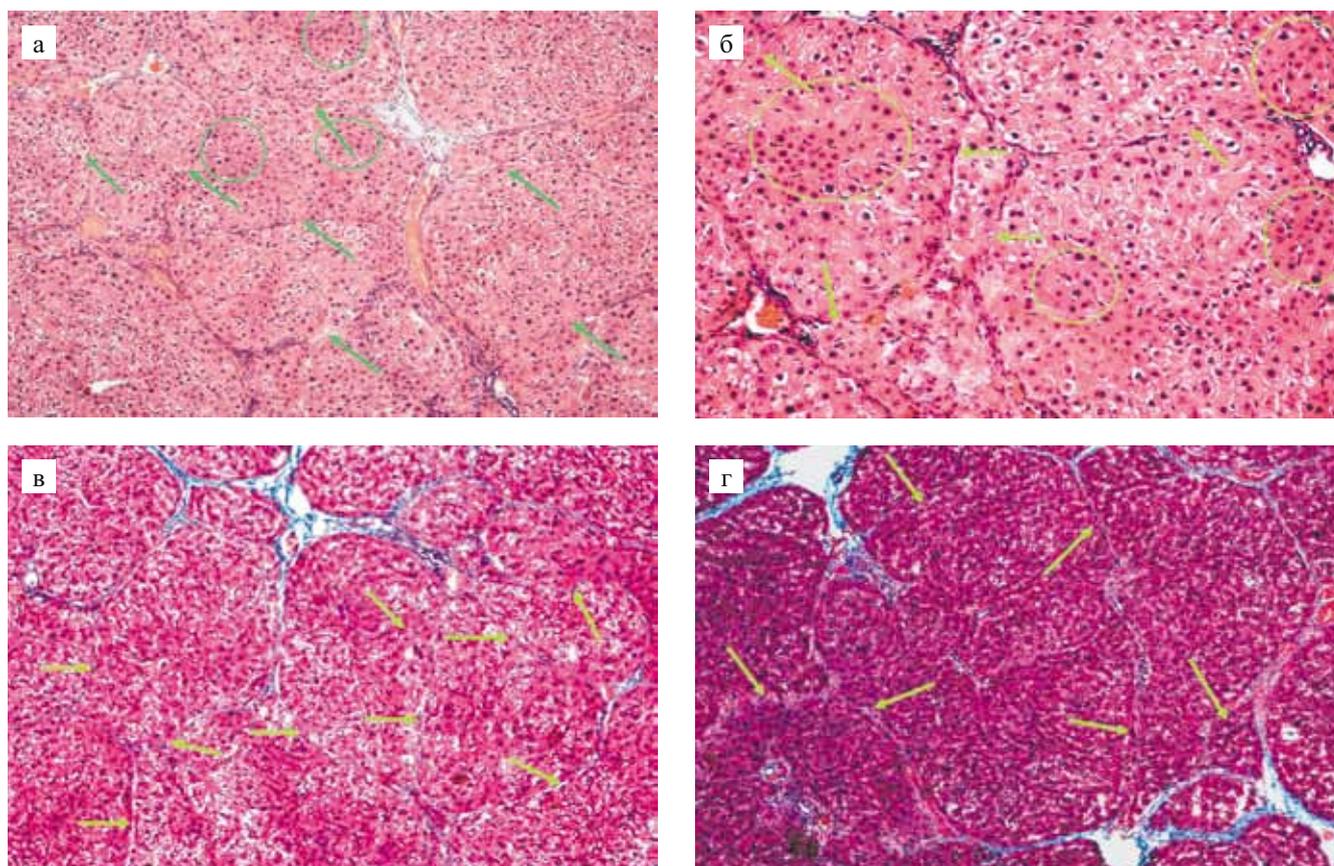


Рис. 4. Гистологическая структура печени крысы через 3 месяца после окончания моделирования ХФПП и введения оРНК из мононуклеарных ККМ в дозе 30 мкг/100 г веса животного. Лизис септ ложных долек и появление значительных участков молодых гепатоцитов. Стрелками указаны зоны лизированных септ; участки скопления молодых гепатоцитов обведены овалом; а и б – окраска гематоксилином и эозином; в и г – окраска по Массону; а, в –  $\times 100$ ; б, г –  $\times 200$

Fig. 4. Histological structure of the rat liver in 3 months after completion of CFLD modeling and infusion of the tRNA from BMMC at a dose of 30 мкг/100 g of animal weight. The septal lysis of false lobules and appearance of significant areas of young hepatocytes. The arrows indicate the zones of lysed septa; the areas of accumulation of young hepatocytes are circled by an oval; a and б – hematoxylin and eosin staining; в and г – Masson staining; а, в –  $\times 100$ ; б, г –  $\times 200$

сохраняются ложные дольки и нарушение балочной структуры печени.

Продолжая динамическое изучение морфологических изменений в печени крыс контрольной и опытных групп, мы отметили, что через 6 месяцев в печени крыс контрольной и опытной группы 3 появляются участки спонтанного лизирования септ ложных долек и зоны молодых гепатоцитов (рис. 5).

В то же время в печени крыс опытной группы 2 к этому сроку, т. е. к 6-му месяцу после введения оРНК, наступает полное восстановление гистологической структуры печени (рис. 6): восстанавливается структура печеночных долек и их балочная структура, происходит полный лизис соединительно-тканых септ в ткани печени и не выявляются какие-либо другие структурные нарушения.

Сравнительное изучение ткани печени в трех исследуемых группах позволяет прийти к заключению, что оРНК из ККМ ускоряет темп восстановления

структуры ткани печени после осуществления хронического токсического фиброзирующего воздействия на нее и что ткань печени крыс имеет огромный потенциал пластичности, так как длительно сохраняет способность к осуществлению спонтанного лизиса фиброзной ткани. В то же время введение ККМ проявляло свое регуляторное воздействие только на функциональные показатели печени и практически не влияло на темп восстановления структурных нарушений в ней, т. к. активизация процессов дефиброзирования печени наступала в те же сроки, что и в контроле. Полученные нами результаты находятся в полном соответствии с наблюдениями клиницистов по применению ККМ при хроническом алкогольном циррозе печени [32]. К 9-му месяцу после хронической заправки крыс структура ткани печени в опытах контрольной и опытной 3-й групп нормализуется, хотя местами в печени крыс 1-й – контрольной груп-

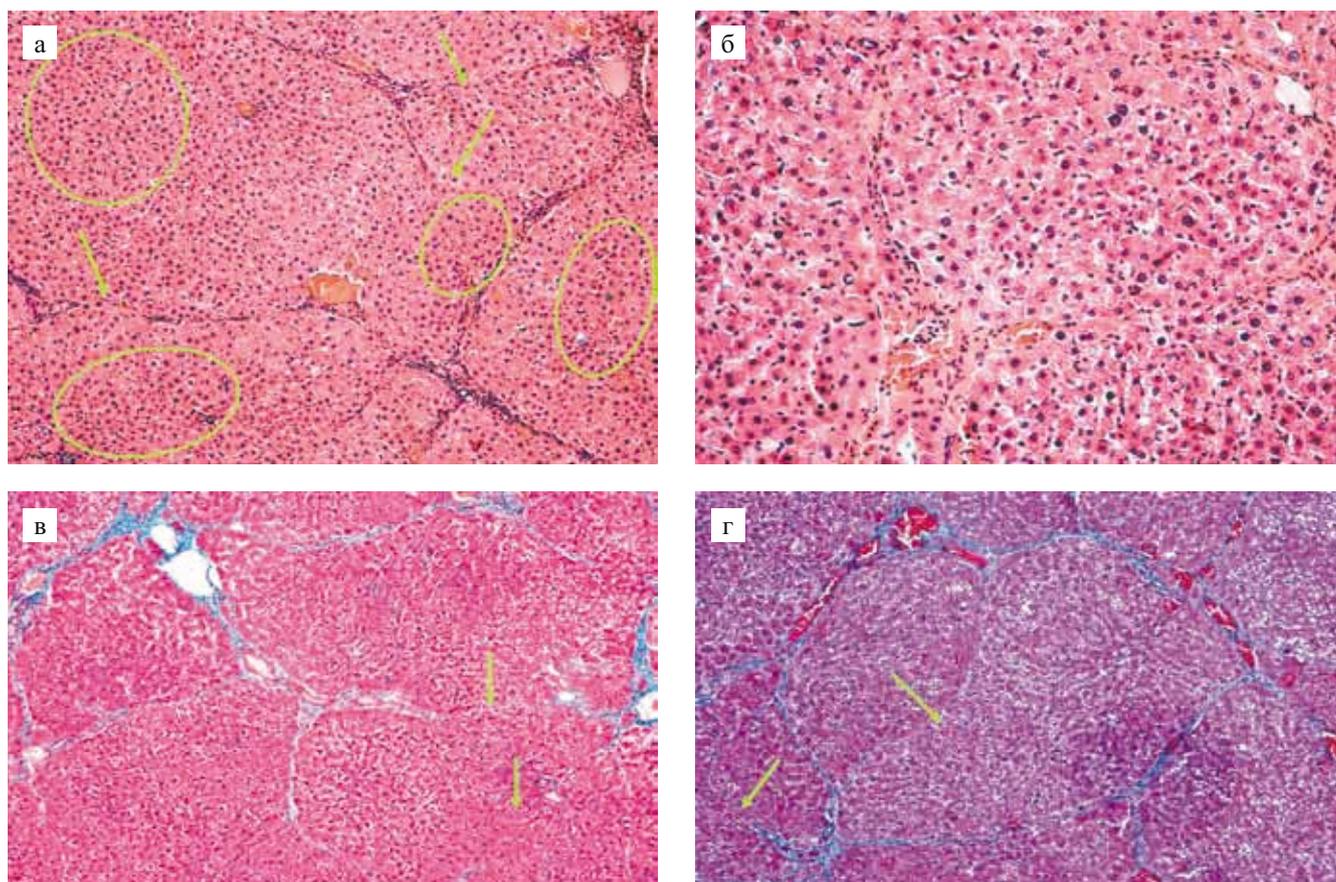


Рис. 5. Гистологическая структура печени крысы через 6 мес. после окончания моделирования ХФПП и введения физиологического раствора (а, в) и мононуклеарных ККМ (б, г). Стрелками указаны участки фибролиза септ ложных долек; видны также зоны молодых (новообразованных) гепатоцитов (обведены овалом); а и б – окраска гематоксилином и эозином; в и г – окраска по Массону; а, в, г –  $\times 100$ ; б –  $\times 200$

Fig. 5. Histological structure of the rat liver in 6 months. after completion of CFLD modeling and infusion of saline (a, v) and BMMC (б, г). The arrows indicate areas of septal fibrolysis of false lobules; it is seen also the areas of young (newly formed) hepatocytes (marked by an oval); a and б – hematoxylin and eosin staining; в and г – Masson staining; а, в, г –  $\times 100$ , б –  $\times 200$

пы сохраняются в отдельных полях зрения участки соединительно-тканых септ (рис. 7).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение динамики развития восстановительных процессов в печени после моделирования ХФПП и применения ККМ и оРНК из ККМ позволяет прийти к следующему заключению.

- Печень исходно здоровых крыс обладает чрезвычайно высоким потенциалом пластичности, т. к., несмотря на хроническую загрузку животных путем комбинированного применения  $CCl_4$  и неполного адьюванта Фрейнда, удается воспроизвести процессы фиброобразования в печени в сроки, не превышающие 6 месяцев. Через 6 месяцев после загрузки по предложенной схеме наступает и во времени прогрессирует процесс спонтанного лизирования фиброзной ткани в печени.
- Введение ККМ от здоровых крыс способствует ускорению восстановления функциональных (био-

химических) показателей поврежденной печени и не влияет на темп восстановления структуры ткани печени, т. к. начало процесса лизирования фиброзной ткани и появление зон молодых гепатоцитов отмечалось, как и в контроле, на 6-м месяце после загрузки.

- Введение оРНК из ККМ здоровых крыс повышает скорость регенераторных процессов в поврежденной печени, что выражается в более раннем восстановлении функциональных и морфологических показателей печени по сравнению с контролем. После однократного введения оРНК уже через 3 месяца возникает лизис фиброзных септ ложных долек и образуются многочисленные зоны молодых (новообразованных) гепатоцитов; к 6-му месяцу после введения оРНК происходит полное восстановление структуры печеночной ткани. Восстановление структуры ткани печени у контрольных крыс и крыс с введением ККМ наступает лишь к 9-му месяцу.

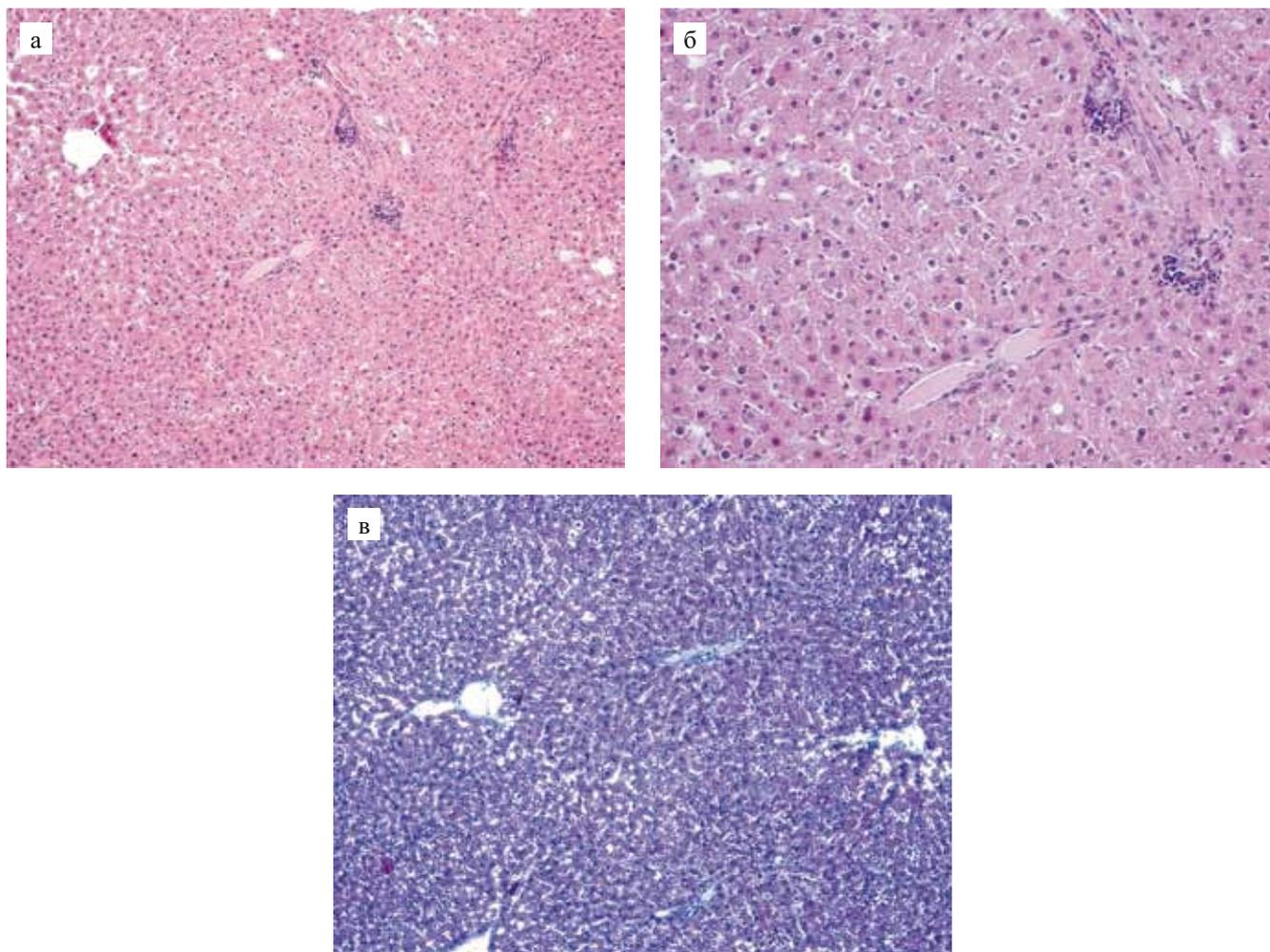


Рис. 6. Гистологическая структура печени крысы через 6 мес. после окончания моделирования ХФПД и введения общей РНК из мононуклеарных ККМ. Восстановление структуры ткани печени. Отсутствие выраженных морфологических признаков фиброза паренхимы: а и б – окраска гематоксилином и эозином; в – окраска по Массону; а и в –  $\times 100$ ; б –  $\times 200$

Fig. 6. Histological structure of the rat liver in 6 months. after completion of CFLD modeling and infusion of the total RNA from BMMC. The restoration of liver tissue structure. The absence of pronounced morphological signs of parenchymal fibrosis: a and б – hematoxylin and eosin staining; в – Masson staining; а and в –  $\times 100$ ; б –  $\times 200$

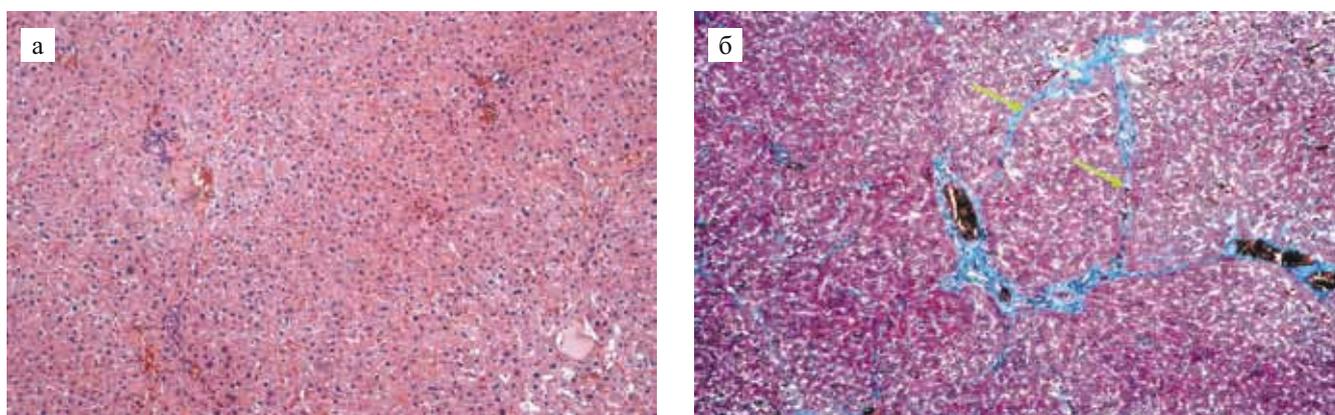


Рис. 7. Гистологическая структура печени крысы через 9 мес. после окончания моделирования ХФПД и введения физиологического раствора (контроль). Стрелками указаны сохранившиеся участки соединительно-тканых септ; а – окраска гематоксилином и эозином; б – окраска по Массону.  $\times 100$

Fig. 7. The Histological structure of the rat liver in 9 months. after completion of CFLD and infusion of saline (control). The arrows indicate the remaining areas of the connective tissue septa; а – hematoxylin and eosin staining; б – Masson staining.  $\times 100$

- оРНК из ККМ здорового донора может быть рекомендована в качестве альтернативного средства биотехнологического воздействия на восстановительную регенерацию этого органа в условиях предложенной экспериментальной модели ХФПП.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Zhou WC, Zhang QB, Qiao L. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World J Gastroenterology*. 2014 Jun 21; 20 (23): 7312–7324.
- Halliday N, Westbrook RH. Liver transplantation: need, indications, patient selection and pre-transplant care. *Br J Hosp Med (Lond)*. 2017; 78 (5): 252–259.
- Olivo R, Guarretera JV, Pysropoulos NT. Liver Transplantation for Acute Liver Failure. *Clin Liver Dis*. 2018 May; 22 (2): 409–417.
- Людуп АВ. Применение мезенхимальных стволовых клеток костного мозга при хроническом фиброзирующем повреждении печени (экспериментальное исследование): Автореферат дис. ... канд. мед. наук. М., 2011. 26 с. Ludup AV. Application of bone marrow mesenchymal stem cells at chronic fibrotic liver damage (experimental study). The author's abstract of thesis (cand. med. sciences). М., 2011. 26 p.
- Pai M, Zacharoulis D, Milicevic MN et al. Autologous infusion of expanded mobilized adult bone marrow-derived CD34+ cells into patients with alcoholic liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol*. 2008; 103: 1952–1958.
- Kuo TK, Hung S et al. Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success for using bone marrow mesenchymal stem cells. *Gastroenterology*. 2008; 134: 2111–2121.
- Souza BS, Nogueira RC, de Oliveira SA et al. Current status of stem cell therapy for liver diseases. *Cell Transplant*. 2009; 18: 1261–1279.
- Amer ME, El-Sayed SZ, El-Kheir WA et al. Clinical and laboratory evaluation of patients with end-stage liver cell failure injected with bone marrow-derived hepatocyte-like cells. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2011; 23: 936–941.
- Takami T, Terai S, Sakaida I. Stem cell therapy in chronic liver disease. *Current Opinion in Gastroenterology*. 2012; 28: 203–208.
- Bonzo LV, Ferrero I, Cravanzola C et al. Human mesenchymal stem cells as a two-edged sword in hepatic regenerative medicine: engraftment and hepatocyte differentiation versus profibrogenic potential. *Gut*. 2008; 57: 223–231.
- Higashiyama R, Moro T, Nakao S et al. Negligible contribution of bone marrow derived cells to collagen production during hepatic fibrogenesis in mice. *Gastroenterology*. 2009 Oct; 137 (4): 1459–1466.
- Carvalho AB, Quintamilha LF, Dias et al. Bone marrow multipotent mesenchymal stem cells do not reduce fibrosis or improve function in a rat model of severe chronic liver injury. *Stem Cells*. 2008; 26: 1307–1314.
- Bihari C, Anand L, Rooge S, Kumar D et al. Bone marrow stem cells and their niche components are adversely affected in advanced cirrhosis of the liver. *Hepatology*. 2016 Oct; 64 (4): 1273–1288.
- Sipeki N, Antal-Szalmás P, Lakatos PL, Papp M. Immune dysfunction in cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2014 Mar 14; 20 (10): 2564–2577.
- Garg V, Garg H, Khan A, Trehanpati N, Kumar A, Sharma BC et al. Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes CD34(+) cells and improves survival of patients with acute-on-chronic liver failure. *Gastroenterology*. 2012; 142: 505–512.
- Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009; 136 (2): 215–233.
- Peterson SM, Thompson JA, Ufkin ML, Sthyanarayana P, Liaw L, Congdon CB. Common features of microRNA target prediction tools. *Frontiers in Genetics*. 2014; 5: 23.
- Yan IK, Wang X, Asmann YW, Haga H, Patel T. Circulating Extracellular RNA Markers of Liver Regeneration. *PLoS One*. 2016; 11 (7).
- Li J, Jin W, Qin Y, Zhao W, Chang C, Xu C. Expression Profile and Function Analysis of lncRNAs during Priming Phase of Rat Liver Regeneration. *PLoS One*. 2016 Jun 21; 11 (6).
- Li C, Chang L, Chen Z, Liu Z, Wang Y, Ye Q. The role of lncRNA MALAT1 in the regulation of hepatocyte proliferation during liver regeneration. *Int J Mol Med*. 2017 Feb; 39 (2): 347–356.
- Lauschke VM, Rezayee F, Nordling A, Hendriks DF, Bell CC, Sison-Young R et al. Massive rearrangements of cellular MicroRNA signatures are key drivers of hepatocyte dedifferentiation. *Hepatology*. 2016; 64 (5): 1743–1756.
- Qiao J, Yao H, Xia Y, Chu P et al. Long non-coding RNAs expression profiles in hepatocytes of mice after hematopoietic stem cell transplantation. *IUBMB Life*. 2016 Mar; 68 (3): 232–241.
- Huang L, Damle SS, Booten S, Singh P, Sabripour M et al. Partial Hepatectomy Induced Long Noncoding RNA Inhibits Hepatocyte Proliferation during Liver Regeneration. *PLoS One*. 2015 Jul 24; 10 (7).
- Mottaghitlab F, Rastegari A, Farokhi M, Dinarvand R, Hosseinkhani H et al. Prospects of siRNA applications in regenerative medicine. *International Journal of Pharmaceutics*. 2017 May 30; 524 (1–2): 312–329.
- Ma H, Shi X, Yuan X, Ding Y. IL-1 $\beta$  siRNA adenovirus benefits liver regeneration by improving mesenchymal stem cells survival after acute liver failure. *Annals of Hepatology*. 2016; 15 (2): 260–270.
- Тишевская НВ, Геворкян НМ, Бабаева АГ, Захаров ЮМ и др. Влияние суммарной РНК лимфоидных клеток селезенки на эритропоэз при экспериментальной полицитемии. *Российский физиол. журнал им. И.М. Сеченова*. 2015; 101 (4): 451–461. Tishevskaya NV, Gevorkyan NM, Babaeva AG, Zakharov YuM. The influence of the total RNA of lymphoid cells of the

- spleen on erythropoiesis at experimental polycythemia. *Rossiyskiy fiziol. zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2015; 101 (4): 451–461.
27. Бабаева АГ, Геворкян НМ, Тишевская НВ, Головкина ЛЛ и др. О гемопоэтических свойствах рибонуклеиновой кислоты лимфоцитов периферической крови больных истинной полицитемией и здоровых доноров. *Онкогематология*. 2015; 2 (10): 58–62. *Babaeva AG, Gevorkyan NM, Tishevskaya NV, Golovkina LL et al.* About hematopoietic properties of ribonucleic acid of peripheral blood lymphocytes of patients with true polycythemia and healthy donors. *Oncogematologiya*. 2015; 2 (10): 58–62.
28. Бабаева АГ, Тишевская НВ, Геворкян НМ. О морфогенетических свойствах РНК лимфоидных и стволовых клеток при восстановительных процессах. РАН. Научно-исследовательский институт морфологии человека. М., 2016. 272 с. *Babaeva AG, Tishevskaya NV, Gevorkyan NM.* About morphogenetic properties of RNA of lymphoid and stem cells at regenerative processes. RAN Research Institute of human morphology. M., 2016. 272 p.
29. *Marcellin P, Levy S, Erlinger S.* Therapy of hepatitis C: patients with normal aminotransferase levels. *Hepatology*. 1997; 26 (3): 1335–1339.
30. Серов ВВ. Сравнительная морфологическая характеристика хронических вирусных гепатитов В и С. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 1999; 9 (1): 36–40. *Serov VV.* Comparative morphological characteristics of chronic viral hepatitis B and C. *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*. 1999; 9 (1): 36–40.
31. *Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle Jay H et al.* Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology*. 1994; 19: 1513–1520.
32. Бурганова ГР, Абдулхаков СР, Гумерова АА и др. Изменение активности воспаления и выраженности фиброза у больных алкогольным циррозом печени после трансплантации аутогенных гемопоэтических стволовых клеток. *Гены и клетки*. 2012; VII (3): 34–36. *Burganova GR, Abdulkhakov SR, Gumerova AA et al.* Changes of inflammation activity and fibrosis severity in patients with alcoholic liver cirrhosis after transplantation of autogenous hematopoietic stem cells. *Genes and Cells*. 2012; VII (3): 34–36.

Статья поступила в редакцию 4.06.2019 г.  
The article was submitted to the journal on 4.06.2019