

DOI: 10.15825/1995-1191-2020-4-43-51

ИНДУКЦИЯ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ CD133+ СТВОЛОВЫХ ЛИМФОЦИТОВ, КОММИТИРОВАННЫХ К ТКАНИ ПЕЧЕНИ, У ПАЦИЕНТОВ ИЗ ЛИСТА ОЖИДАНИЯ ТРАНСПЛАНТАЦИИ

А.Н. Шутко¹, О.А. Герасимова^{1, 2}, Н.В. Марченко^{1, 2}, Ф.К. Жеребцов¹

¹ ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация

² ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Российская Федерация

Исследования регенераторных возможностей тканей доказали восстановление поврежденной печени с помощью стволовых гемопоэтических клеток (СГК), которые способны не только замещать клетки в органе-мишени, но также могут доставлять трофические факторы, поддерживающие эндогенную регенерацию печени. Данных о том, как органопроизводные гуморальные сигналы вовлекают такие морфогенные/трофические клетки в циркуляцию, практически нет. **Цель:** исследовать роль неинвазивного вибро-механического чрескожного воздействия на печень при циррозе с помощью количественного учета в крови фракции CD133+ гемопоэтических стволовых клеток лимфоидного ряда со специфическим печеночным маркером альфа-фетопротеином (АФП) у больных, ожидающих трансплантацию печени. **Методы.** Для повышения в крови числа АФП-положительной части CD133+ стволовых лимфоидных клеток механически активировали цирротическую печень пациента путем чрескожной микровибрации с помощью контактирующих с кожей электромагнитных виброфонов, генерирующих механические импульсы амплитудой 10 мкм и плавно меняющейся частотой от 0,03 Гц до 18 кГц и обратно в течение одного цикла продолжительностью 1 минута. Количество АФП-положительной фракции лимфоцитов в общем содержании CD133+ СГК в лимфоцитах потенциальных реципиентов контролировали методом проточной цитометрии до и во время ежедневного 15-минутного сонирования кожной зоны, соответствующей проекции печени, в течение трех недель, восемью синфазированными виброфонами. **Результаты.** Звуковое воздействие на зону проекции печени достоверно увеличило количество печеночно-специфических АФП-положительных CD133+ лимфоцитов крови в 2–3 раза по сравнению с базовыми значениями. Повторное аналогичное сонирование той же зоны после трехнедельного перерыва показало статистически не значимое превышение исходного уровня. При аналогичном воздействии на проекцию позвоночника в контрольной группе больных циррозом печени из листа ожидания феномен увеличения альфа-фетопротеин-положительных CD133+ лимфоцитов не возникал. **Вывод.** Механический стресс побуждает орган секретировать специфические гуморальные сигналы, провоцирующие костный мозг производить дополнительные коммитированные к печени стволовые лимфоидные клетки и рекрутировать их в циркуляцию.

Ключевые слова: стволовые гемопоэтические клетки, цирроз печени, регенерация, лист ожидания, механическая микровибрация.

Для корреспонденции: Герасимова Ольга Анатольевна. Адрес: 197758, Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, 70. Тел. (812) 439-66-40. E-mail: ren321@mail.ru

Corresponding author: Olga Gerasimova. Address: 70, Leningradskaya str., Pesochnyy town, St. Petersburg, 197758, Russian Federation. Phone: (812) 439-66-40. E-mail: ren321@mail.ru

INDUCTION OF CIRCULATING CD133+ STEM CELLS COMMITTED TO CIRRHOTIC LIVERS IN WAITLISTED PATIENTS

A.N. Shoutko¹, O.A. Gerasimova^{1, 2}, N.V. Marchenko^{1, 2}, F.K. Zhrebtsov¹

¹ Granov Russian Scientific Center of Radiology and Surgical Technology, St. Petersburg, Russian Federation

² St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Studies on the regenerative capabilities of tissues have shown that damaged liver can recover using hematopoietic stem cells (HSCs), which are able not only to replace cells in the target organ, but can also deliver trophic factors that support endogenous liver regeneration. There is practically no data on how organ-derived humoral signals involve such morphogenic/trophic cells in circulation. **Objective:** to investigate the role of non-invasive vibromechanical percutaneous action on the liver in cirrhosis by quantification of CD133+ lymphoid HSCs with specific hepatic marker alpha-fetoprotein (AFP) in patients awaiting liver transplantation. **Materials and methods.** In order to increase the number of AFP+ part of CD133+ stem lymphoid cells in the blood, the patient's cirrhotic liver was mechanically activated by transcutaneous microvibration using electromagnetic vibraphones in contact with the skin. This generated mechanical impulses with a 10 µm amplitude and a smoothly varying frequency from 0.03 kHz to 18 kHz and back to within one cycle lasting 1 minute. The amount of AFP+ lymphocyte fraction in the total content of CD133+ HSCs in lymphocytes of potential recipients was monitored by flow cytometry before and during daily 15-minute sonication of the skin zone corresponding to the liver projection for three weeks with eight synphased vibraphones. **Results.** Sonication of the liver projection zone significantly increased the number of liver-specific CD133+ AFP+ lymphocytes by 2–3 times compared to the baseline values. Repeated similar sonication of the same site after a three-week break showed a statistically insignificant increase from the initial level. With a similar effect on the spinal projection in the control group of waitlisted patients with cirrhosis, there was no increase in CD133+ AFP+ lymphocytes. **Conclusion.** Mechanical stress prompts the organ to secrete specific humoral signals that provoke the bone marrow to produce additional lymphoid stem cells committed to the liver and recruit them into circulation.

Keywords: hematopoietic stem cells, cirrhosis, regeneration, waiting list, mechanical microvibration.

ВВЕДЕНИЕ

Кроветворение и нормальные ткани

Большинство примитивных мононуклеарных клеток в костном мозге и крови взрослых представлены маркерами CD133+CD34–, CD133+CD34+, CD133–CD34+, при этом маркер CD133 является более ранним по отношению к CD34. Интенсивно пролиферирующие CD133+-клетки способны дифференцироваться в клетки с характеристиками мезо-, эндо- и нейродермального слоев, а именно эндотелиальные клетки-предшественники, нервные клетки-предшественники, астроциты, олигодендроциты, клетки проксимальных канальцев почек, клетки протоков молочной железы, клетки предстательной железы, кожи, легких, кишечника, гепатоцитарные клетки и скелетные мышечные клетки, экспрессируя основные тканевые белки [1, 2]. Примитивные клетки костного мозга мигрируют через кровь в различные ткани и органы, особенно после их повреждения [3]. Имеются многочисленные доказательства усиления регенерации тканей в результате стимуляции примитивных клеток костного мозга или их введения в организм [4–6]. Таким образом, идея о костном мозге как источнике циркулирующих коммитированных к тканям морфогенных стволовых клеток находит

свое подтверждение. Эндотелий сосудов обновляется с помощью циркулирующих CD133+-клеток-предшественников из костного мозга [7]. Даже если примитивные клетки костного мозга не трансдифференцируются, как предлагают некоторые исследователи, то они агрегируют с другими клетками хозяина (феномен «fusing») или выделяют регенераторные цитокины и питательные вещества [8], поддерживая, таким образом, регенерацию целевой ткани. Наиболее ранние лимфоциты, а также мононуклеарные стволовые и клетки-предшественники проникают через стенки капилляров в интерстиций нелимфоидных тканей, в т. ч. в печень, для того чтобы поддерживать динамическое пролиферативное равновесие, то есть гомеостаз в нормальных условиях [9]. Такие клетки жертвуют собой в поддержку функции окружающих клеток с другим фенотипом. Например, ТДТ+ пролимфоциты, γδ-Т-клетки (CD4–CD8–) [10] и CD3+CD31+CXCR4+ ангиогенные Т-лимфоциты [11] участвуют непосредственно в обновлении клеточного состава тканей путем производства факторов роста, питательных веществ и поддержания процессов ангиогенеза. Все эти клетки, согласно прогнозу Фидлера [12], являются не иммунocyтaми, а скорее трофоцитами, питающимися лимфоцитами-фидерами.

Стволовые клетки и печень

Известно, что хроническое повреждение печени приводит к нефункциональной регенерации, которая контролируется взаимодействием между клетками тканей печени (гепатоциты, печеночные звездчатые клетки, воспалительные клетки, клетки билиарного эпителия, синусоидальные эндотелиальные клетки), в исходе формируется фиброз-цирроз [13]. Наряду с собственно печеночными клетками рекрутированные из циркуляции СГК из костного мозга также могут способствовать регенерации печени путем слияния с поврежденными гепатоцитами, или путем дифференцировки в гепатоцит-подобные клетки, или посредством их морфогенных и проангиогенных ростовых факторов [14–16]. Колонистимулирующие факторы лимфоцитов, модулирующие кроветворение, используются для мобилизации ГСК в кровотоки с целью реверсии индуцированных хронических повреждений печени, однако подход имеет стандартные ограничения по количеству циклов и гематологической токсичности агентов [17]. Внутривенные инфузии аутологичных СГК, выделенных из предварительно аспирированного объема костного мозга, представляют собой еще один инвазивный подход к искусственному обогащению микроокружения цирротической печени клеточными элементами аутологичных СГК [18].

Трансплантат печени у больных циррозом может быть сам по себе естественным долгосрочным стимулом для рекрутирования в периферическую кровь дополнительных ГСК [19], подтверждая существование гуморального информационного пути (оси) между этими двумя тканями. Интересно, что СГК, продуцируемые во время эмбрионального развития печени, имеют способность к трафику между различными тканями, так же, как СГК у взрослых, и они в обоих случаях обеспечиваются гуморальными сигналами, регулируемые достаточно жестко, чтобы достигать своих конечных пунктов назначения [20, 21].

В период ожидания трансплантации печени представляется крайне интересным найти возможность индуцировать прорегенераторные паракринные сигналы, исходящие от паренхимы органа в оси «печень – костный мозг».

Имея положительный опыт дистанционного неинвазивного рекрутирования СГК в кровь путем умеренной чрескожной механической микровибрации губчатых костей, содержащих активный («красный») костный мозг [22–24], мы предположили, что аналогичное механическое воздействие (стресс) на измененную ткань печени, возможно, откроет дополнительные возможности позитивного взаимодействия между АФП+ морфогенными ГСК и печеночными клетками.

Целью исследования явилось изучение воздействия чрескожной механической микровибрации на мобилизацию из костного мозга коммитированных к печени СГК посредством гуморальных сигналов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включили 9 пациентов в возрасте от 53 лет до 61 года с циррозом печени, ожидающих трансплантацию печени; 6 из 9 пациентов получили курсы механической вибрации через контактирующие с кожей виброфоны на проекционную зону печени; 3 пациента получили вибрацию в проекции позвоночника аналогичным способом. Сертифицированный серийный аппарат «Витафон-5» (ГОСТ 50444-92 а ТУ 9444-009-23138557-2009 РФ) был использован в качестве источника электромеханических колебаний для виброакустического воздействия. Кроме того, для сравнения использовали данные, полученные от 6 здоровых добровольцев, возраст которых не отличался от испытуемых. Стандартные виброфоны синхронно и синфазно производили механические колебания в циклическом режиме. В течение одного цикла (60 секунд) частота колебаний изменялась от 0,03 Гц до 18 кГц и в обратной последовательности при постоянной амплитуде колебаний около 10 мкм. Блок виброфонов (с диаметром 45 мм каждый) состоял из двух рядов (по четыре в ряду) с расстояниями между центрами рядов 75 мм и центрами виброфонов в пределах каждого ряда 55 мм. Таким образом, блок формировал активное прямоугольное поле механических микровибраций 12 × 22 см, удерживаемое плоской тканевой рамкой с восемью крепежными гнездами и мягкие креплениями для плотной фиксации на теле человека.

До воздействия у всех пациентов осуществляли забор крови для проведения клинического и биохимического анализа. Вибрационное воздействие выполнялось один раз в день в течение 15 минут, в кресле (положение полулежачего). Использовали две схемы воздействия: первая (I) включала 15 минут воздействия ежедневно, в течение трех недель, вторая (II) – по 15 минут ежедневно в течение трех недель, затем перерыв три недели и повторное воздействие.

Контрольная схема (III) состояла из механических микровибраций одновременно на 8 пар равноудаленных точек вдоль позвоночника с расстоянием между виброфонами в каждой паре по 0,5 см, в течение 3 недель (2-я, 3-я, и 4-я) по 15 минут ежедневно.

Один раз в неделю определяли доли циркулирующих лимфоцитов в синтетической фазе S+, CD133+, CD31+-клеток в лимфоидной фракции, доли двойных положительных клеток АФП+CD133+, АФП+CD31+, и производные соотношения (АФП+CD133+) / CD133+, (АФП+CD31+) / CD31+ и АФП+CD133+ / АФП+CD31+. Для этого из периферической крови выделяли фракцию мононуклеарных клеток (МНК)

путем классического разделения на градиенте плотности фикола, опуская заключительный этап обогащения [25]. Жизнеспособность МНК оценивали с помощью теста исключения трипанового синего. Клетки из двух равных частей фракции МНК окрашивали для анализа на проточном цитометре LSR Fortessa (Becton-Dickinson). Окрашиваие Hoechst 33342 использовали для анализа клеточного цикла, как описано ранее [26], с небольшими изменениями.

Фенотипы циркулирующих клеток в лимфоцитарной части МНК оценивали с использованием моноклональных антител к маркерам CD133/2, CD31, АФП (α-фетопротеин), конъюгированным с аллофиико-цианином (APC), флуоресцеин изотиоцианатом (FITC) и фикоэритрином (PE) соответственно.

Параметры оценивали статистически с расчетом среднего значения (M) и стандартной ошибки (SE). Значения M сравнивались с использованием t-критерия и вероятности p. Кинетические тенденции

параметров до и после озвучивания характеризовали математическими функциями, генерируемыми автоматически с использованием нелинейных приближений в программе Excel. Коэффициент R2 использовался в качестве статистической меры добротности подгонки линии регрессии к данным. Удовлетворительные значения R2 были подтверждены с помощью уравнения для t-параметра: $t = R2 \times (n - 2) / (1 - R2)$ [27].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Относительное уменьшение S+, CD31+-клеток и незначительное увеличение CD133+-клеток характерны для пациентов, ожидающих трансплантации печени, по сравнению со здоровыми добровольцами (табл., рис. 1).

В результате акустического воздействия на область печени по двум схемам к 4–5-й неделе нормализовалось содержание S+, CD31+ и CD133+ до

Таблица

Базовые показатели циркулирующих лимфоцитов у здоровых добровольцев

Baseline indicators of circulating lymphocytes in healthy volunteers

Параметры	CD133+	CD133+ АФП+	CD31+	CD31+ АФП+	s	CD133+/CD31+	CD133+АФП+/CD31+АФП+	CD133+АФП+/CD133+	CD31+АФП+/CD31+
M	0,037	0,0052	40,1	0,39	0,95	0,101*	1,64*	12,36*	0,97*
SD	0,012	0,0044	9,2	0,36	0,98	0,037	1,25	8,22	0,74
SE	0,004	0,0015	3,1	0,12	0,28	0,013	0,44	2,90	0,24
KV	0,32	0,84	0,23	0,92	1,03	0,37	0,76	0,66	0,76

Примечание. * – Получены путем усреднения личных коэффициентов.

Note. * – Obtained by averaging personal odds.

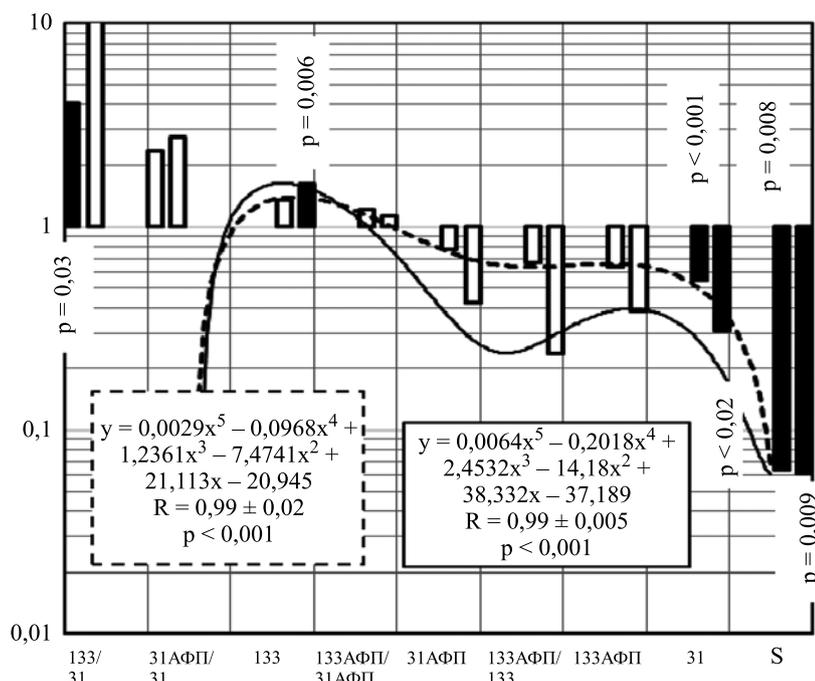


Рис. 1. Относительные изменения усредненных параметров (M) при циррозе печени к таковым для здоровых добровольцев, принятых за 1,0. Правые столбцы соответствуют данным, полученным в первую неделю до воздействия по схеме I (сплошная аппроксимирующая линия). Левые столбцы соответствуют данным, полученным до воздействия по схеме II и схеме III (пунктирная линия). Статистически достоверные отклонения показаны черным

Fig. 1. Changes in the mean parameters (M) in cirrhosis relative to those for healthy volunteers, taken as 1.0. The right-hand columns correspond to the data obtained in the first week before sonication according to Scheme I (solid approximation line). The left-hand columns correspond to the data obtained before sonication according to Scheme II and Scheme III (dashed line). Statistically significant deviations are shown in black

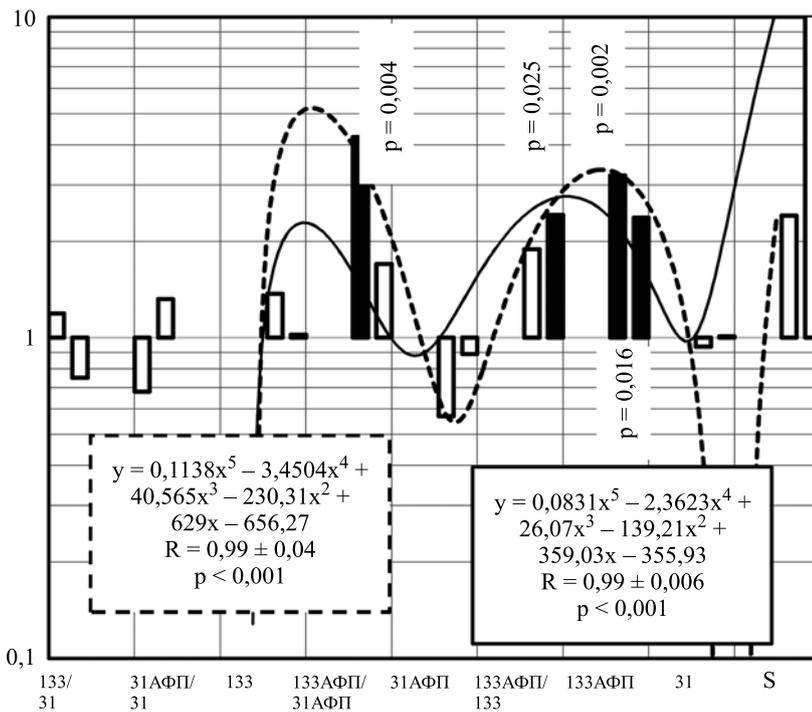


Рис. 2. Относительные изменения усредненных параметров (М) к 4–5 неделям воздействия на область печени в сравнении с данными для больных на рис. 1, принятыми за 1,0. Правые и левые столбцы показывают относительные данные, полученные к 4–6 неделям после начала воздействия по схеме I (сплошная линия, правые столбцы) и схеме II (пунктирная линия, левые столбцы). Статистически достоверные отклонения показаны черным

Fig. 2. Changes in the mean parameters (M) by 4–5 weeks of sonication compared to the liver area relative to the data for patients in Fig. 1, taken as 1.0. The right and left columns show the relative data obtained by 4–6 weeks after the start of sonication according to Scheme I (solid line, right columns) and Scheme II (dashed line, left columns). Statistically significant deviations are shown in black

лечения (рис. 2). Кроме того, увеличилось количество клеток с двойной позитивностью CD133+АФП+, коммитированных к ткани печени. Такое воздействие можно считать специфичным для воздействия на область печени, поскольку при использовании третьей схемы звукового воздействия в проекции позвоночника увеличивалась только популяция CD133+ (рис. 3). Вибрационный стресс позвоночника значительно увеличивал количество некоммутированных CD133+-клеток в циркуляции, превысив не только их

количество до воздействия, но и уровень этих клеток после первого курса воздействия на печень (рис. 3).

Реальные концентрации, соответствующие рис. 2, равны $0,07 \pm 0,022 \pm 0,0125$ (схема I) и $0,079 \pm 0,037 \pm 0,0099$ (схема II). Эти средние значения возросли при воздействии на позвоночник по схеме III в 1,95 раза ($p = 0,006$) и 1,75 раза ($p = 0,008$) соответственно.

Каких-либо специфичных изменений на 10–12-й неделе при воздействии по сравнению данными до него не обнаружено (рис. 4). Полученное к 4–5-й неделям по схеме I увеличение количества

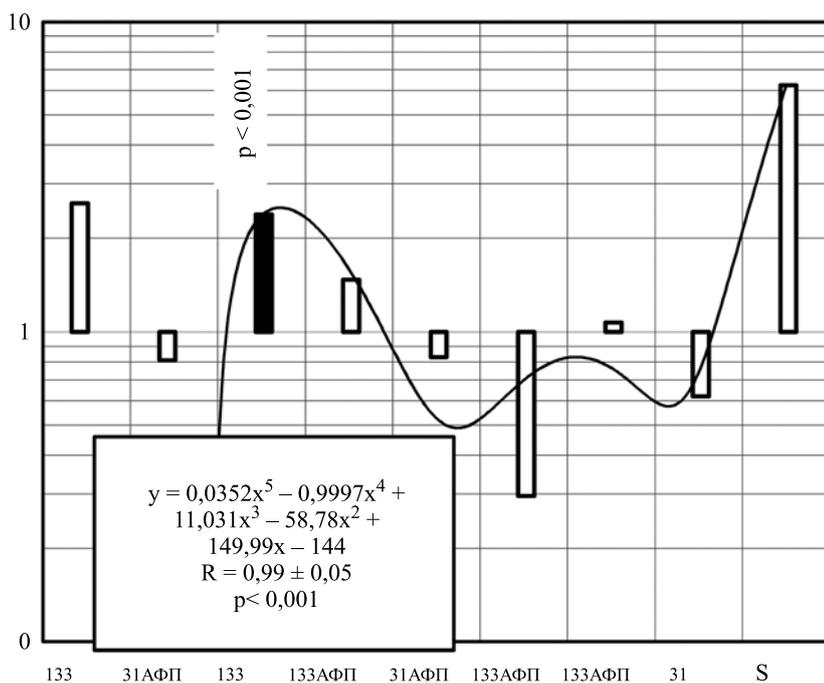


Рис. 3. Относительные изменения усредненных параметров клеток после воздействия на область позвоночника (схема III) к таковым у здоровых (рис. 1), принятым за 1,0. В колонках приведены относительные данные, полученные на 4–6-й неделе

Fig. 3. Changes in the mean cell parameters after sonication of the spine (Scheme III) relative to those in healthy people (Fig. 1), taken as 1.0. The columns show the relative data obtained at 4–6 weeks

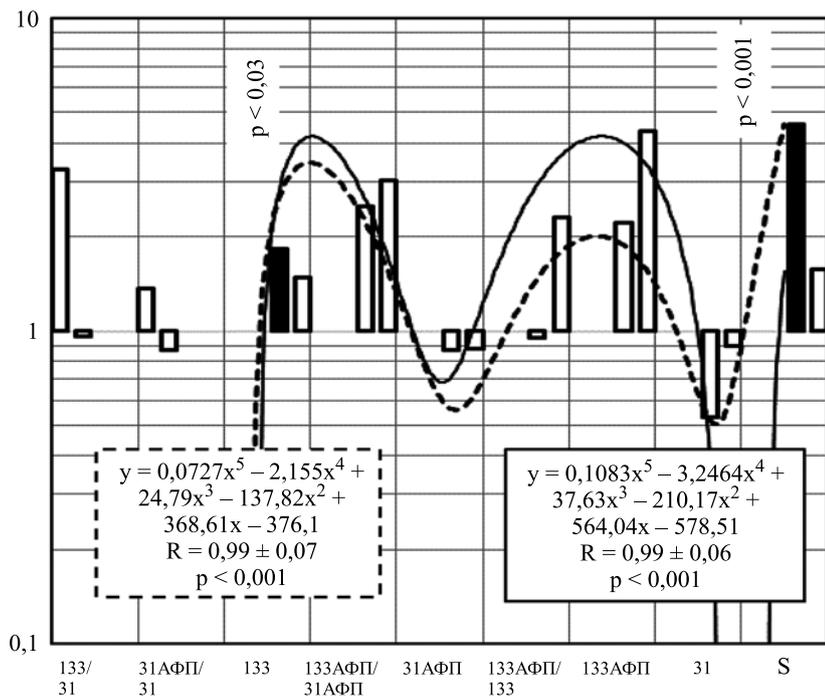


Рис. 4. Относительные изменения усредненных клеточных параметров (M) в течение 10–12 недель по сравнению с исходными (столбцы справа со сплошной линией аппроксимации). Графики показывают относительные данные, полученные на 10–12-й неделе после начала воздействия по схеме I (сплошная линия, правые столбцы) и схеме II (пунктирная линия, левые столбцы)

Fig. 4. Changes in mean cell parameters (M) over 10–12 weeks compared to baseline (right-hand columns with solid approximation line). The columns show the relative data obtained at 10–12 weeks after the start of sonication according to Scheme I (solid line, right columns) and Scheme II (dashed line, left columns)

CD133+АФП+-клеток и отношения CD133+АФП+ / CD133 (рис. 2) утрачивало статистическую достоверность к 10–12-й неделе (рис. 4). После повторного воздействия на зону печени по схеме II специфическое увеличение CD133+АФП+-клеток исчезало на 10–12-й неделе, но клетки замещались неспецифическими CD133+-клетками, повышенный уровень которых сохранялся (рис. 1, пунктирная линия, левый столбец для CD133+).

Таким образом, явление не прямой чрескожной механической мобилизации коммитированных к тканям печени CD133+АФП+ стволовых клеток в лимфоцитарном пуле возникает в течение 4–6 недель воздействия и ослабляется к 10–12 неделям, независимо от продолжения воздействия (схема II) или его прекращения (схема I).

ОБСУЖДЕНИЕ

Очевидно, что физические факторы играют важную роль в биологических процессах. Применение растягивающего ткани напряжения, напряжения сдвига, электромагнитных полей и ультразвука вызывает варианты усиления остеогенеза и хондрогенеза, вовлекая в процесс стволовые клетки человека. Поэтому прямое физическое вмешательство представляется потенциально привлекательным подходом и может использоваться для поддержания регенерации тканей.

Метод акустического неинвазивного воздействия на печень при компенсированном циррозе печени представляется перспективным. Ранее некоторые исследователи сообщали, что печень проявляет механический резонанс в пределах зарегистрирован-

ной частоты 30–400 Гц, в зависимости от нечетных гармоник 1–3 порядков [28]. Сама ткань печени имеет собственную частоту около 55–60 МГц [29]. Для неинвазивного воздействия на эту комплексную систему с малоизвестными физическими свойствами механические колебания казались обещающими, так как они принципиально могут производить стохастический резонанс (SR) в нелинейных биологических системах, усиливая подпороговые стимулы в метаболических путях [30, 31]. Мы ожидали, что гуморальные сигналы пока неизвестной природы от искусственного напряжения тканей печени достигнут лимфопоэтических ниш костного мозга и интенсифицируют естественную продукцию коммитированных к печени морфогенных CD133+АФП+-лимфоцитов или усилят их рекрутирование в циркуляцию на фоне их первоначального угнетения при циррозе. В случае правильности предположения мы бы смогли получить новый подход для неинвазивной и долгосрочной поддержки функции печени пациентов, ожидающих пересадку. Для повышения вероятности резонансных процессов в тканях печени мы выбрали источник механических колебаний в широком диапазоне частот [24].

Использование циркулирующих лимфоцитов в качестве объектов в данном исследовании обусловлено несколькими причинами. Во-первых, лимфоидные клетки обладают наиболее развитыми и гибкими механизмами навигации к различным тканям, или тропностью, а также содержат фракции морфогенных/трофических клеток, таких как стволовые CD133+, CD34+, лимфоидные стволовые TdT+-клетки, ангиогенные CD31 T+-клетки и другие

трофические лимфоциты промежуточной степени дифференцировки, которые обычно называют регуляторными. Во-вторых, лимфоцитопоз является наиболее повреждаемым процессом, и лимфоидная ткань отличается самой высокой амортизацией, то есть потерей фактической и функциональной массы за время жизни организма [32]. В-третьих, при различных заболеваниях органов, в том числе печени, наихудшие прогнозы связаны с высоким отношением числа нейтрофилов к числу лимфоцитов крови (т. н. нейтрофильно-лимфоцитарный индекс), что акцентирует роль ослабления именно лимфоцитопоза в утрате жизнеспособности организма в целом [33].

В результате исследования образцов крови у больных с циррозом печени был зарегистрирован дефицит наивных CD31+-лимфоцитов с ангиогенными свойствами [11, 34], а также дефицит лимфоцитов, находящихся в S-фазе синтеза ДНК. Первый курс воздействия на печень или позвоночник нормализовал оба дефицита. Таким образом, это явилось аргументом против специфичности двух указанных эффектов.

Напротив, при первом воздействии на печень увеличивается количество коммитированных CD133+АФП+-клеток, что кажется вполне специфичным для тканей печени. Мы интерпретируем возрастающее число клеток CD133+АФП+ как отдаленный результат специфической паракринной стимуляции, возникающей дистанционно в результате механических резонансных напряженной паренхимы печени. Гуморальный стимул, направленный к репродуктивной системе костного мозга, специфически активирует ее, рекрутируя трофические/морфогенные стволовые клетки костного мозга лимфоидного ряда для целевого поддержания функции поврежденной печени [35]. Сигналами могут быть либо легко растворимые молекулярные вещества в плазме, либо циркулирующие внеклеточные везикулы размером десятых микрон, обнаруженные недавно [36]. В любом случае механическая вибрация, вероятно, имитирует повреждение печени, воспринимаемое исполнительным звеном физиологической оси «лимфоцитопоз – печень» как реальное.

Несколько типов клеток печени могут быть мишенью для такого взаимодействия с CD133+АФП+-лимфоцитами. Среди паренхиматозных клеток органа имеется популяция CD133+ овальных клеток с функцией примитивных, «бипотентных» стволовых клеток печени [37, 38], но они не несут маркер АФП [39]. Именно поэтому самый молодой тип печеночной стволовой клетки (HepSCs) едва ли является мишенью для АФП+CD133+-лимфоцитов. Незрелые «унипотентные» гепатобласты, которые возникают во время регенеративных процессов в печени, имеют антигенный профиль с сильно положительной экспрессией как CD133, так и печеночно-специфического

АФП-маркера [40,41]. Таким образом, они с большей вероятностью могут рассматриваться как мишени для CD133+АФП+-мигрантов [5].

Как бипотентные клетки (HepSCs), так и незрелые унипотентные гепатобласты лишены, по крайней мере, одного из двух маркеров – АФП или CD31 [40]. Мы не регистрировали никаких статистических доказательств реакции АФП+CD31+-лимфоцитов на воздействие вибраций. Это соответствие может быть дополнительным аргументом в пользу того, что гепатоциты являются наиболее вероятным индуктором гуморальных стимулов, равно как и мишенью для коммитированных клеток лимфоидного ряда. Примечательно, что второй курс воздействия на область печени (схема II) не изменял затухания эффекта от первого курса в CD133+АФП+ субпопуляции. Причины этого полностью не ясны, но общее торможение лимфоцитопоза у пациентов с циррозом печени и связанная с ним нестабильность/турбулентность гемоцитопоза [5, 20] могут быть одной из возможных причин. С другой стороны, исходно истощенная/амортизированная природная способность цирротической паренхимы продуцировать паракринные сигналы также может быть причиной изменения чувствительности к механическому напряжению по сравнению с интактным органом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование позволяет подтвердить возможность косвенного и неинвазивного увеличения числа трофических лимфоидных стволовых клеток, коммитированных к печеночной ткани у пациентов с циррозом печени. Предложенная нами новая методика специфична и не имеет ограничений в повторном применении. Полученные результаты рассматриваются нами только как терапевтическая дорожная карта для неинвазивной поддержки регенерации печени при циррозе у больных из листа ожидания трансплантации печени. Для оценки клинических эффектов необходимы дальнейшие исследования.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Drapeau C. Cracking the Stem Cell Code: Demystifying the most dramatic scientific breakthrough of our times. Sutton Hart Press, Hillsboro; 2010.
2. Kucia M, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Bone marrow as a source of circulating CXCR4+ tissue-committed stem cells. *Biol Cell*. 2005; 97 (2): 133–146. doi: 10.1042/BC20040069.
3. Stroo I, Stokman G, Teske GJ, Florquin S, Leemans JC. Haematopoietic stem cell migration to the ischemic da-

- maged kidney is not altered by manipulating the SDF-1/CXCR4-axis. *Nephrol Dial Transplant*. 2009; 24: 2082–2088. doi: 10.1093/ndt/gfp050.
4. Kolvenbach R, Kreissig C, Cagiannos C, Affifi R, Schmaltz E. Intraoperative adjunctive stem cell treatment in patients with critical limb ischemia using a novel point-of-care device. *Ann Vasc Surg*. 2010; 24: 367–372. doi: 10.1016/j.avsg.2009.07.018.
 5. Shoutko AN, Gerasimova OA, Ekimova LP, Zherebtsov FK, Mus VF, Granov DA. Long-term activation of circulating liver-committed mononuclear cells after OLT. *Jacobs Journal of Regenerative Medicine*. 2016; 1 (3): 1–9. <https://jacobspublishers.com/>.
 6. Halin C, Mora J, Sumen C, von Andrian UH. In vivo imaging of lymphocyte trafficking. *Ann Rev Cell Dev Biol*. 2005; 21: 581–603. doi: 10.1146/annurev.cellbio.21.122303.133159.
 7. Wassmann S, Werner N, Czech T, Nickenig G. Improvement of endothelial function by systemic transfusion of vascular progenitor cells. *Circ Res*. 2006; 99: 74–83. doi: 10.1161/01.RES.0000246095.90247.d4.
 8. Burchfield JS, Dimmeler S. Role of paracrine factors in stem and progenitor cell mediated cardiac repair and tissue fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2008; 1: 1–11. doi: 10.1186/1755-1536-1-4.
 9. Strick-Marchand H, Masse GX, Weiss MC, Di Santo JP. Lymphocytes support oval cell dependent liver regeneration. *J Immunol*. 2008; 181: 2764–2771. doi: 10.4049/jimmunol.181.4.2764.
 10. Rouillet M, Gheith SMF, Mauger J, Junkins-Hopkins JM, Choi JK. Percentage of $\{\gamma\}$ $\{\delta\}$ T cells in panniculitis by paraffin immunohistochemical analysis. *Am J Clin Pathol*. 2009; 13: 1820–1826.
 11. Hur J, Yang H-M, Yoon C-H, Lee C-S, Park K-W et al. Identification of a novel role of T cells in postnatal vasculogenesis. Characterization of endothelial progenitor cell colonies. *Circulation*. 2007; 116: 1671–1682. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.694778.
 12. Shoutko A., Shatinina N. Chronic cancer could it be? *Coherence Int J Integrated Med*. 1998; 2: 36–40.
 13. Ding B-S, Cao Z, Lis R, Nolan DJ, Guo P, Simons M et al. Divergent Angiocrine Signals from vascular niche balance liver regeneration and fibrosis. *Nature*. 2014; 505: 97–102. doi: 10.1038/nature12681.
 14. Woo DH, Kim SK, Lim HJ, Heo J, Park HS, Kang GY et al. Direct and indirect contribution of human embryonic stem cell-derived hepatocyte-like cells to liver repair in mice. *Gastroenterology*. 2012; 142: 602–611. doi: 10.1053/j.gastro.2011.11.030.
 15. Ratajczak J, Kucia M, Mierzejewska K, Marlicz W, Pietrzowski Z, Wojakowski W et al. Paracrine proangiopoietic effects of human umbilical cord blood-derived purified CD133+ cells – implications for stem cell therapies in regenerative medicine. *Stem Cells and Dev*. 2013; 22: 422–430. doi: 10.1089/scd.2012.0268.
 16. Liu W-H, Ren L-N, Wang T, Navarro-Alvarez N, Tang L-J. The involving roles of intrahepatic and extrahepatic stem/progenitor cells (SPCs) to liver regeneration. *Int J Biol Sci*. 2016; 12: 954–963. doi: 10.7150/ijbs.15715.
 17. Tsolaki E, Athanasiou E, Gounari E, Zogas N, Siotou E, Yiangou M et al. Hematopoietic stem cells and liver regeneration: differentially acting hematopoietic stem cell mobilization agents reverse induced chronic liver injury. *Blood Cells Mol Dis*. 2014; 53: 124–132. doi: 10.1016/j.bcmd.2014.05.003.
 18. Mohamadnejad M, Vosough M, Moossavi S, Nikfam S, Mardpour S, Akhlaghpour S et al. Intraportal infusion of bone marrow mononuclear or CD133+ cells in patients with decompensated cirrhosis: a double-blind randomized controlled trial. *Stem Cells Transl Med*. 2016; 5 (1): 87–94, doi: 10.5966/sctm.2015-0004
 19. Lemoli RM, Catani L, Talarico S, Loggi E, Gramenzi A, Baccarani U et al. Mobilization of bone marrow-derived hematopoietic and endothelial stem cells after orthotopic liver transplantation and liver resection. *Stem Cells*. 2007; 24: 2817–2825. doi: 10.1634/stemcells.2006-0333.
 20. Shoutko AN, Gerasimova OA, Ekimova LP, Zherebtsov FK, Mus VF, Matyurin KS et al. Lymphocyte reproductive activity normalized to numbers of hematopoietic stem cells in blood and rate of death in fatal diseases. *Int J of Genetics and Genomics*. 2017; 5: 54–62. doi: 10.11648/j.ijgg.20170505.12.
 21. Heinig K, Sage F, Robin C, Sperandio M. Development and trafficking function of haematopoietic stem cells and myeloid cells during fetal ontogeny. *Cardiovasc Res*. 2015; 107 (3): 352–363. doi: 10.1093/cvr/cvv146.
 22. Karamullin M, Baback A, Ekimova L, Phedorov V, Kireeva E, Sosukin A et al. The blood stem cell’s pool modulation in remote period improved health status of Chernobyl clean-up workers. *Radioprotection*. 2008; 43: 89. doi: 10.1051/radiopro:2008667.
 23. Baback A, Karamullin M, Ekimova L, Phedorov V, Kireeva E, Sosukin A et al. Exercise performance vs. growth of haemopoietic stem cells amount in CUWs blood after noninvasive modulation. *Radioprotection*. 2008; 43: 161. doi: 10.1051/radiopro:2008724.
 24. Шутко АН, Федоров ВА. Способ обогащения крови стволовыми кроветворными клетками. Патент РФ № 2166924, 20.07.2008. Shoutko AN, Fedorov VA. Способ obogashcheniya krovi stvolovymi krovetvornymi kletkami. Patent RF № 2166924, 20.07.2008. <http://rupatent.info/21/65-69/2166924.html>.
 25. Eaker ShS, Hawley TS, Ramezani A, Hawley RG. Detection and enrichment of hematopoietic stem cells by side population phenotype. Hawley TS and Hawley RG, Eds., *Methods in molecular biology: flow cytometry protocols*, 2nd Edition, Humana Press Inc., Totowa, 2008: 161–180. doi: 10.1385/1-59259-773-4:161.
 26. Sales-Pardo I, Avendaño A, Martínez-Muñoz V, García-Escarp M, Celis R, Whittle P et al. Flow cytometry of the side population: tips and tricks. *Cellular Oncology*. 2006; 28: 37–53. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16675880>.
 27. Loveland JL. Mathematical justification of introductory hypothesis tests and development of reference materials. All graduate plan B and other reports. Utah State University, Logan, 14. 2013.
 28. Oldenburg AL, Boppart SA. Resonant acoustic spectroscopy of soft tissues using embedded magnetomotive na-

- notransducers and optical coherence tomography. *Physics in Medicine & Biology*. 2010; 55: 1189–1201. doi: 10.1088/0031-9155/55/4/019.
29. Sharma A, Maurya AK. Aggregate frequencies of body organs. *Int J of Electrical, Electronics and Data Communication*. 2017; 5: 94–98. <http://iraj.in>.
30. Arredondo LT, Perez CA. Spatially coincident vibrotactile noise improves subthreshold stimulus Detection. *PLoS One*. 2017; 12 (11): e0186932. doi: 10.1371/journal.pone.0186932.
31. Milanese C, Cavedon V, Sandri M, Tam E, Piscitelli F, Boschi et al. Metabolic effect of bodyweight whole-body vibration in a 20-min exercise session: a crossover study using verified vibration stimulus. *PLoS One*. 2018. 31; 13 (1): e0192046. doi: 10.1371/journal.pone.0192046.
32. Richardson RB, Allan DS, Lea Y. Greater organ involution in highly proliferative tissues associated with the early onset and acceleration of ageing in humans. *Experimental Gerontology*. 2014; 55: 80–91. doi: 10.1016/j.exger.2014.03.015.
33. Agiasotelli D, Alexopoulou A, Vasilieva L, Kalpakou G, Papadaki S, Dourakis SP. Evaluation of neutrophil/leukocyte ratio and organ failure score as predictors of reversibility and survival following an acute-on-chronic liver failure event. *Hepatology Research*. 2016; 46: 514–520. doi: 10.1111/hepr.12582.
34. Ashman LK, Aylett GW. Expression of CD31 epitopes on human lymphocytes: CD31 monoclonal antibodies differentiate between naïve (CD45RA+) and memory (CD45RA-) CD4-positive T cells. *Tissue Antigens*. 1991; 38: 208–212. doi: 10.1111/j.1399-0039.1991.tb01899.x.
35. Huch M, Dolle L. The plastic cellular states of liver cells: are EpCAM and Lgr5 fit for purpose? *Hepatology*. 2016; 64: 652–662. doi: 10.1002/hep.28469.
36. Teixeira JH, Silva AM, Almeida MI, Barbosa MA, Santos SG. Circulating extracellular vesicles: their role in tissue repair and regeneration. *Transfus Apher Sci*. 2016; 55 (1): 53–61. doi: 10.1016/j.transci.2016.07.015.
37. Rountree CB, Barsky L, Ge SH, Zhu J, Senadheera SH, Crooks GM. A CD133-expressing murine liver oval cell population with bilineage potential. *Stem Cells*. 2007; 25: 2419–2429. doi: 10.1634/stemcells.2007-0176.
38. Corbeila D, Fargeasa CA, Jászai J. CD133 might be a pan marker of epithelial cells with dedifferentiation capacity. *PNAS*. 2014; 111: E1451–E1452. doi: 10.1073/pnas.1400195111.
39. Turner R, Lozoya O, Wang Y, Cardinale V, Gaudio E, Alpini G et al. Human hepatic stem cell and maturation liver lineage biology. *Hepatology*. 2011; 53: 1035–1045. doi: 10.1002/hep.24157.
40. Haruna Y, Saito K, Spaulding S, Nalesnik MA, Gerber MA. Identification of bipotential progenitor cells in human liver development. *Hepatology*. 1996; 23: 476–481. doi: 10.1002/hep.510230312.
41. Liang OD, Korff T, Eckhardt J, Rifaat J, Baal N, Herr FT et al. Oncodevelopmental alphafetoprotein acts as a selective proangiogenic factor on endothelial cell from the fetomaternal unit. *J of Clin Endocrinology & Metabolism*. 2004; 89: 1415–1422. doi: 10.1210/jc.2003-031721.

Статья поступила в редакцию 23.04.2020 г.
The article was submitted to the journal on 23.04.2020