

DOI: 10.15825/1995-1191-2021-4-110-118

РОЛЬ АПОПТОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ПРИ АКТИВАЦИИ РЕГЕНЕРАЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ В ПЕЧЕНИ

Н.А. Онищенко¹, А.О. Никольская¹, З.З. Гоникова¹, Л.А. Кирсанова¹, М.Ю. Шагидулин^{1, 2}, В.И. Севастьянов¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

² ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени

И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Российская Федерация

Цель. На модели адоптивного переноса изучить клеточные механизмы формирования начальной стадии регенерационных процессов в печени при внутрибрюшинном введении здоровому реципиенту апоптотических мононуклеарных клеток костного мозга (ККМ) донора после обширной резекции печени. **Материалы и методы.** На крысах-самцах породы Wistar (n = 40) создавали модель адоптивного переноса здоровому реципиенту апоптотических ККМ (а-ККМ), изъятых у донора после обширной резекции печени. При проведении экспериментов животные были разделены на 5 групп. Четыре опытные группы с внутрибрюшинным введением реципиенту одинаковых доз: свежесыворотных ККМ (группа 1); ККМ, подвергнутых апоптозу в течение 48 часов путем хранения при t = 4–6 °С в растворе фосфатного буфера – PBS (группа 2) или в растворе Кустодиол НТК (группа 3); в группе 4 животным вводили PBS после хранения в нем ККМ. Контролем были животные с введением физиологического раствора (группа 5). Для выбора эффективных режимов индукции апоптоза ККМ, окрашенные 7AAD после инкубации в растворах, анализировали методом проточной цитометрии. Адресный перенос регенерационных сигналов реципиенту оценивали по митотической активности гепатоцитов в печени и канальцевого эпителия в почках, а также по интенсивности микроструктурных изменений в печени через 24, 48 и 72 часа после введения исследуемого материала. **Результаты.** Инкубирование ККМ в PBS и НТК в течение 48 часов при t = 4–6 °С обеспечивает наиболее эффективное накопление а-ККМ в состоянии раннего апоптоза. Показано, что а-ККМ при адоптивном переносе сохраняют способность адресной передачи регуляторных сигналов в печень, поддерживаемых процессом аутофагии. Установлено, что а-ККМ (группы 2 и 3) по сравнению с нативными ККМ (группа 1) при адоптивном переносе усиливают регенерационный потенциал печени за счет выраженного повышения активности процессов аутофагии и направленной инфильтрации печени иммуномодулирующими мононуклеарными клетками. **Заключение.** а-ККМ создают более прочную основу для выработки и осуществления адресной и эффективной регенерационной программы путем усиления процессов аутофагии и иммуномодулирующего воздействия на мононуклеарные клетки – переносчики регенерационных сигналов.

Ключевые слова: апоптоз, аутофагия, клетки костного мозга, печень, резекция, регенерация.

THE ROLE OF APOPTOTIC BONE MARROW CELLS IN ACTIVATION OF LIVER REGENERATION

N.A. Onishchenko¹, A.O. Nikolskaya¹, Z.Z. Gonikova¹, L.A. Kirsanova¹, M.Yu. Shagidulin^{1, 2}, V.I. Sevastianov¹

¹ Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

² Sechenov University, Moscow, Russian Federation

Objective: using an adoptive transfer model to study the cellular mechanisms involved in the formation of the initial stage of liver regeneration during intraperitoneal injection of a healthy recipient with apoptotic bone marrow-derived mononuclear cells (BM-MNCs) from a donor after extended liver resection. **Materials and methods.**

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

Corresponding author: Zalina Gonikova. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation. Phone: (966) 188-33-33. E-mail: zalina3392@gmail.com

Male Wistar rats ($n = 40$) were used to create a model of adoptive transfer of apoptotic BM-MNCs (a-BM-MNCs) taken from the donor after extended liver resection to a healthy recipient. During the experiments, the animals were divided into five groups. Four experimental groups with intraperitoneal injection of the same doses to the recipient: freshly isolated BM-MNCs (group 1); BM-MNCs subjected to apoptosis for 48 hours by storage at $t = 4-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ in phosphate-buffered saline (PBS) (group 2) or in a Custodiol HTK solution (group 3). In group 4, the animals were injected with PBS after storing BM-MNCs in it. The control animals were animals injected with saline (group 5). For selection of effective modes of apoptosis induction, BM-MNCs stained with 7AAD after incubation in solutions were analyzed by flow cytometry. Targeted transfer of regenerative signals to the recipient was assessed by the mitotic activity of hepatocytes in the liver and tubular epithelium in the kidneys, as well as by the intensity of microstructural changes in the liver 24, 48 and 72 hours after injection of the studied material. **Results.** BMC incubation in PBS and HTK for 48 hours at $t = 4-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ provides the most effective accumulation of a-BM-MNCs in early apoptosis. It was shown that a-BM-MNCs retain the ability to target-focused transmission of regulatory signals to the liver supported by autophagy process during adoptive transfer. It was established that a-BM-MNCs (groups 2 and 3) in comparison to native BM-MNCs (group 1) at adoptive transfer increased the regenerative potential of the liver due to pronounced increase in the activity of autophagy processes and directed infiltration of immunomodulatory mononuclear cells in the liver. **Conclusion.** a-BM-MNCs create a stronger basis for development and implementation of a targeted and effective regeneration program by enhancing autophagy processes and immunomodulatory effect on mononuclear cells, which are regenerative signal carriers.

Keywords: apoptosis, autophagy, bone marrow cells, liver, resection, regeneration.

ВВЕДЕНИЕ

Повреждения органов и тканей через механизмы ауторегуляции включают в организме эволюционно выработанные процессы регенерации. Адресный перенос регенерационных сигналов в поврежденные ткани осуществляют мононуклеарные иммунорегуляторные клетки крови, и прежде всего лимфоциты [1–3]. Гемопоэтические и стромальные клетки костного мозга (ККМ) также обладают высоким регенерационным потенциалом. Однако эффект от клинического применения ККМ оказался не столь выраженным и не всегда воспроизводимым [4, 5], что заставило исследователей обратиться к изучению механизмов активации регенерационных процессов ККМ с целью повышения их регуляторной роли.

Первоначальное мнение о влиянии процессов трандифференцировки или слияния (fusion) стволовых/прогениторных ККМ с дифференцированными клетками на регенерацию поврежденной ткани/органа не подтвердилось [6–9]. Активацию регенераторных процессов под воздействием ККМ, а также супернатанта, полученного после их культивирования, стали связывать с действием паракринных факторов, выделяемых этими клетками [10–13].

Дальнейшее изучение альтернативных механизмов индукции восстановительных процессов клетками костномозгового происхождения [14] позволило Thum et al. выдвинуть гипотезу [15], согласно которой за усиление регенераторных процессов при терапии этими клетками ответственны клетки, продуцирующие паракринные факторы в состоянии апоптоза, содержание которых в пуле ККМ колеблется от 5 до 25%.

На первый взгляд, мнение, что умирающие апоптотические клетки способны повысить выживание

других клеток, кажется абсурдным, но вместе с тем такое представление содержит в себе эволюционную оправданность и рационализм, используемые живыми организмами для поддержания своей жизнедеятельности [16–19] и защиты от развития патологических состояний [20–22].

Известно, что именно апоптотические клетки выделяют в организм ростостимулирующие сигналы в виде нановезикул [23], липидов [24], экзосом, микро-РНК и белков [25], которые не только ускоряют восстановительные процессы в организме, но и оказывают иммуномодулирующее воздействие, блокирующее воспалительные реакции, которые, являясь интегральной частью любого повреждения, препятствуют регенерации.

К настоящему времени гипотеза об определяющей регуляторной роли апоптотических клеток костномозгового происхождения в регенерационных процессах является доказанной [26] и была многократно подтверждена преclinical исследованиями на клеточных суспензиях и в опытах на животных с моделированием различных патологических процессов [27].

Между тем ранние изменения в поврежденных органах, возникающие в ответ на индукционное воздействие апоптотических ККМ (а-ККМ), более эффективно регулирующих восстановительные процессы, не были предметом специальных исследований.

Целью настоящего исследования явилось изучение на модели адоптивного переноса клеточных механизмов формирования начальной стадии регенерационных процессов в печени при внутрибрюшинном введении здоровому реципиенту апоптотических мононуклеарных клеток костного мозга (а-ККМ) донора после обширной резекции печени (ОРП).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на крысах самцах породы Wistar весом 250–300 г ($n = 40$).

Способность а-ККМ регулировать и адресно доставлять регенерационные сигналы в ткань поврежденного органа (печень) изучали методом адоптивного переноса [1]. Для этого у донора создавали экспериментальную модель ОРП -70–75%, которая, как известно, сопровождается активацией механизмов гипертрофической регенерации с выраженной митотической активностью в оставшейся части органа [28]. Крысы с ОРП составили донорскую группу ($n = 15$). У крыс-доноров забирали костный мозг через 12 часов после резекции печени (указанный интервал необходим для появления в костном мозге морфогенетически активных клеток) и получали из него мононуклеарную (гемопоэтическую) фракцию ККМ для последующего однократного внутрибрюшинного введения этих клеток интактным (неоперированным) крысам-реципиентам ($n = 20$) в 4 опытных группах, различающихся по способу активации апоптоза.

Использовали свежeweделенные несортированные мононуклеарные ККМ донора в дозе $3,0\text{--}3,5 \times 10^7$ клеток на крысу, (группа 1, $n = 5$), а также мононуклеарные апоптотические ККМ (а-ККМ) в той же дозе, активированные путем инкубации в растворе фосфатного буфера – PBS (группа 2, $n = 5$) или в консервирующем ион-сбалансированном растворе Кустодиол – НТК (группа 3, $n = 5$) при температуре $4\text{--}6\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 48 часов.

В группе 4 использовали кондиционированную среду – раствор фосфатного буфера – PBS после 48 часов хранения в нем ККМ ($n = 5$). Контролем служили интактные крысы с введением 1 мл физиологического раствора (группа 5, $n = 5$).

Для выбора режимов и сроков активации апоптоза мононуклеарных ККМ было проведено сравнительное изучение динамики развития обратимого и необратимого апоптоза ККМ при инкубации в растворе фосфатно-солевого буфера (PBS) фирмы «ПанЭко» (Россия) и в консервирующем растворе Кустодиол (раствор НТК-гистидин-триптофан-кетоглутарат) фирмы «Др. Франц-Келлер Хеми» (Германия) при разных температурах ($18\text{--}22\text{ }^\circ\text{C}$ и $4\text{--}6\text{ }^\circ\text{C}$) и различных сроках инкубации (6, 18, 24, 48 и 72 часа).

При указанных сроках и температурных режимах хранения мононуклеарные ККМ сохраняют жизнеспособность и поддерживают свой структурно-функциональный гомеостаз за счет эволюционно выработанного механизма – аутофагии – адаптивной структурно-функциональной и энергетической перестройки собственных метаболических резервов, которая сопровождается постепенным развитием

раннего обратимого, а затем позднего необратимого апоптоза клеток.

Для выявления раннего апоптоза и позднего апоптоза/некроза ККМ при инкубации клеток в течение указанных сроков использовали набор FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-AAD (BioLegend, США). Клетки суспендировали в 100 мкл буфера связывания Аннексина V в пределах 1×10^7 клеток/мл и смешивали с 5 мкл FITC-конъюгированного Annexin V и 7-AAD (краситель 7 аминоктомицин D проникает в ядра только нежизнеспособных клеток и интерколирует в двойную спираль ДНК). Позитивно окрашенные, т. е. нежизнеспособные, мононуклеарные клетки в используемом пуле ККМ при исследовании с помощью 7-AAD должны составлять не более 7–10% [29]. После инкубации при комнатной температуре в течение 15 мин в темноте к смесям добавляли 400 мкл связующего буфера Annexin V. Окрашенные клетки затем анализировали с помощью проточного цитометра Beckman Coulter Cytomics FC 500 с надлежащими настройками прибора.

Способность к усилению адресного (печень) переноса регенерационных сигналов мононуклеарными а-ККМ оценивали по выраженности пролиферативной активности гепатоцитов в печени по сравнению с канальцевым эпителием почек (контроль адресного воздействия). Также оценивали выраженность мононуклеарной клеточной инфильтрации этих органов (макрофагами и лимфоцитами) у интактных крыс-реципиентов через 24, 36, 48 и 72 часа после введения им донорских свежeweделенных и а-ККМ.

В указанные сроки иссекали печень и почки у крыс-реципиентов, готовили из них гистологические препараты, окрашенные гематоксилином и эозином. Используя микроскоп фирмы Leica DML5 (Германия), проводили гистологический анализ препаратов и определяли в 30 полях зрения количество митотически делящихся клеток, а затем рассчитывали митотический индекс (МИ) в промилле (‰).

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследований влияния составов инкубационных растворов, сроков и температурных режимов инкубации в них ККМ на активацию раннего (обратимого) и необратимого апоптоза/некроза клеток представлены на рис. 1 и 2. Из рис. 1 видно, что при комнатной температуре инкубации ($t = 18\text{--}22\text{ }^\circ\text{C}$) мононуклеарных ККМ в растворах НТК и PBS через 18 и 24 часа преобладают клетки в состоянии позднего апоптоза, процентное содержание которых превышает допустимый уровень [29].

В то же время хранение ККМ в тех же растворах при $t = 4\text{--}6\text{ }^\circ\text{C}$ тормозило развитие в клетках позднего

апоптоза и повышало в динамике хранения (к 48 и 72 ч) содержание ККМ в состоянии раннего (обратимого) апоптоза, которое было достоверно более выраженным через 48 и 72 часа для клеток в растворе НТК – $44,8 \pm 10,9\%$, $51,84 \pm 12,2\%$ против $29,5 \pm 7,1\%$ и $38,6 \pm 10,8\%$ в растворе PBS (рис. 2). Так как после 48 часов хранения ККМ в растворах НТК и PBS в них было выявлено наиболее высокое содержание клеток в состоянии раннего обратимого апоптоза, а содержание ККМ в состоянии позднего апоптоза не превышало 7–10% ($p < 0,02$), то регуляторные возможности именно этих клеток были изучены нами

в разных группах опытов при моделировании адоптивного переноса.

Во всех исследуемых группах и на всех исследуемых сроках после введения клеток реципиенту достоверные изменения митотической активности гепатоцитов в печени и клеток канальцевого эпителия в почках (контроль тканеспецифичности адоптивного переноса) отсутствовали.

Значения митотического индекса (МИ) для печени и почек на сроках 36, 48 и 72 часа в группах 1–4 не превышали $0,02 \pm 0,01\%$ (0–2 митоза на 30 полей зрения) и так же, как в группе 5, не отличались от

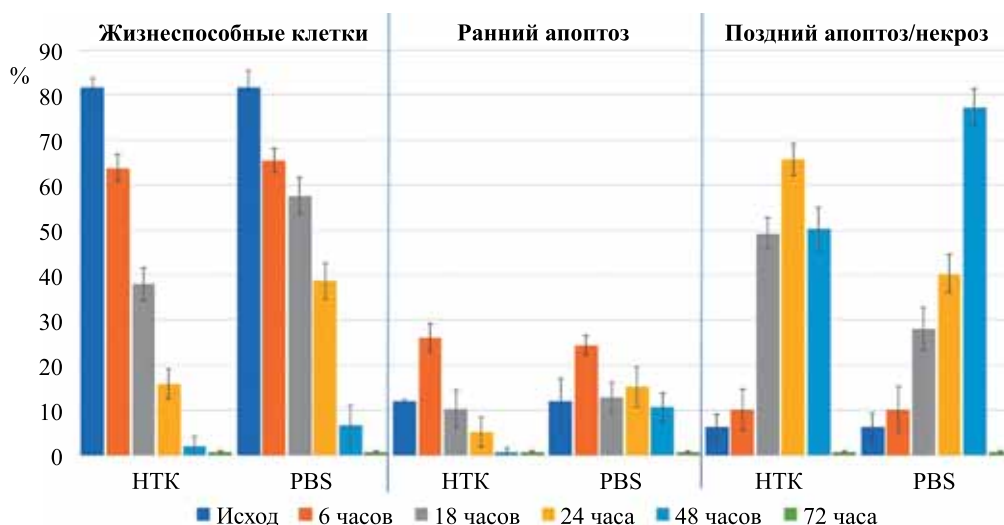


Рис. 1. Динамика изменения содержания жизнеспособных клеток, клеток в состоянии раннего апоптоза и позднего апоптоза/некроза в процессе инкубирования ККМ в растворах PBS и Кустодиол (НТК) при $t = 18–22$ °C

Fig. 1. Dynamics of changes in the content of viable cells, cells in the state of early apoptosis and late apoptosis/necrosis during incubation of BMC in PBS and Custodiol (HTK) solutions at $t = 18–22$ °C

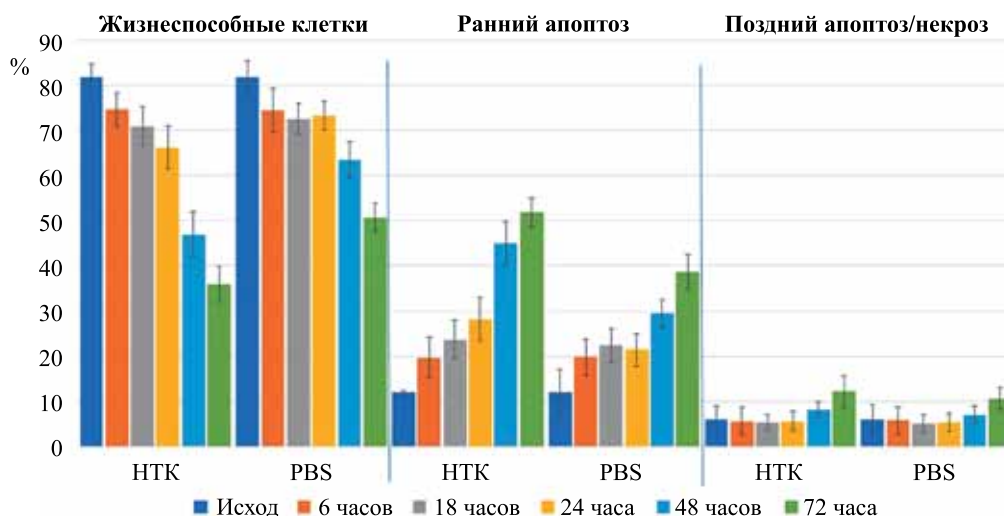


Рис. 2. Динамика изменения содержания живых клеток, клеток в состоянии раннего апоптоза и позднего апоптоза/некроза в процессе инкубирования ККМ в растворах PBS и Кустодиол (НТК) при $t = 4–6$ °C

Fig. 2. Dynamics of changes in the content of living cells, cells in the state of early apoptosis and late apoptosis/necrosis during incubation of BMC in a solution of PBS and Custodiol (HTK) at $t = 4–6$ °C

исходных значений. На рис. 3 представлена гистологическая картина ткани печени крыс-реципиентов на различных сроках после введения а-ККМ, инкубированных в растворе Кустодиол (группа 3). Ожидаемого подъема митотической активности гепатоцитов в печени крыс-реципиентов с применением апоптотически индуцированного донорского материала после ОРП (на разных сроках после его введения) нами не было обнаружено.

В то же время известно, что после введения лимфоцитов селезенки донора, предварительно активированных ОРП, в организме интактного реципиента достоверно возрастает митотическая активность не только гепатоцитов, но и клеток Купфера [1]. В связи с этим мы ожидали аналогичный эффект для гепатоцитов печени реципиента и при введении а-ККМ донора после ОРП.

Между тем, исходя из современных представлений о регенерации, полученный нами результат (отсутствие митозов) не является удивительным. На ранних этапах после воздействия повреждения для запуска регенерационного процесса в сохранившихся клетках поврежденного органа происходит направленная мобилизация энергетических и метаболических резервов клеток с развитием их аутофагии, которая предопределяет эффективность последующего восстановительного процесса [30–33].

Ранее методом морфоцитометрии нами было также показано, что в ткани печени крыс на самых ранних сроках (до 48 часов) после ОРП происходит мобилизационное увеличение клеточной плотности, снижение массы печени, уменьшение площадей гепатоцитов, их ядер и цитоплазмы [34], и эти факты подтверждают важную индукционную роль ауто-

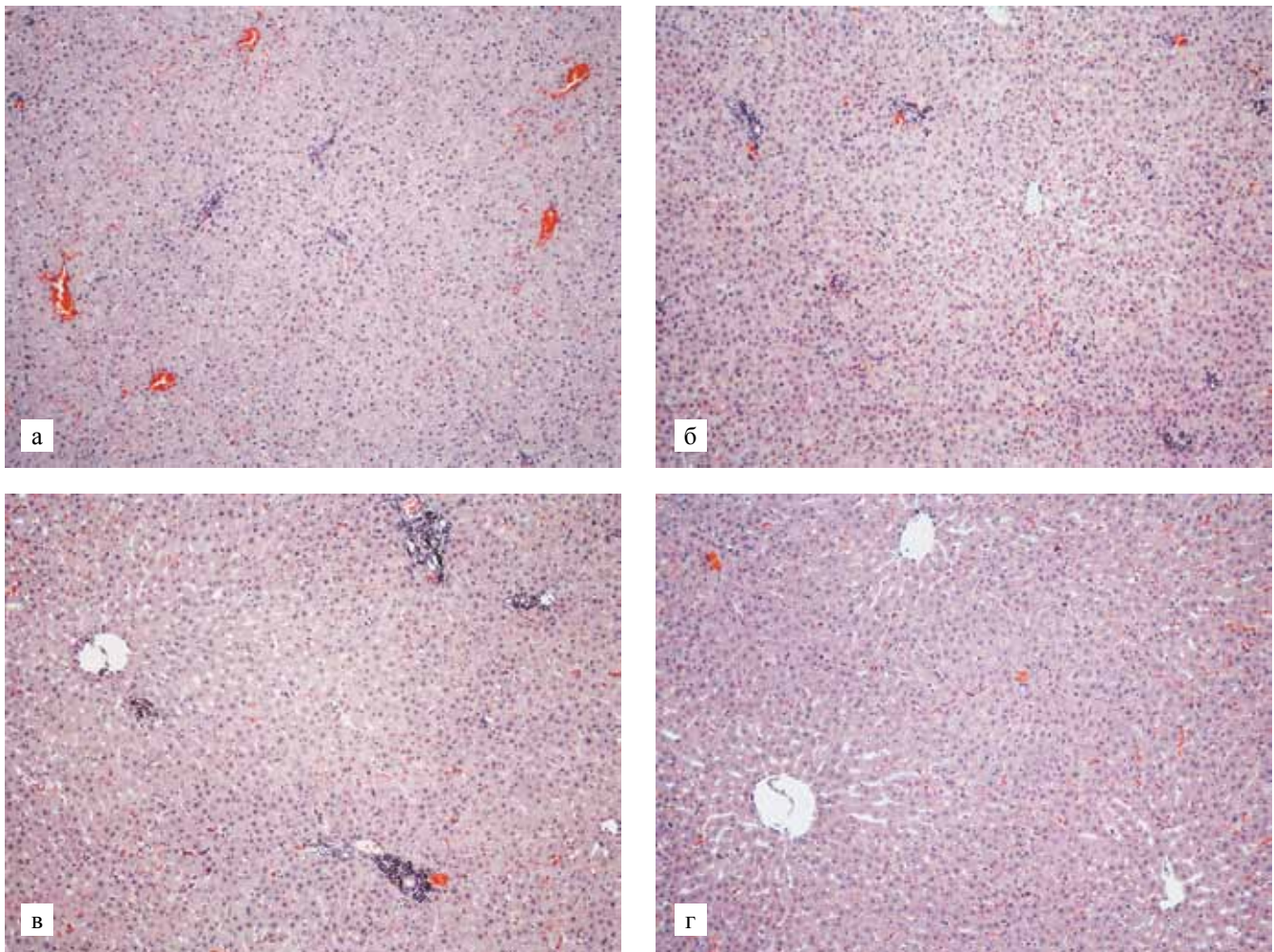


Рис. 3. Гистологическая структура ткани печени на различных сроках после введения а-ККМ (группа 3): а – 24 часа, б – 36 часов, в – 48 часов, г – 72 часа. Отсутствие митотической активности гепатоцитов на всех сроках наблюдения. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

Fig. 3. Histological structure of liver tissue at various times after administration of a-BMC (group 3): а – 24 hours, б – 36 hours, в – 48 hours, г – 72 hours. Mitotic activity of hepatocytes at the all periods of observation is absent. Staining with hematoxylin and eosin, magnification $\times 100$

фагии и раннего обратимого апоптоза для запуска эффективного регенерационного процесса.

В экспериментах на модели адоптивного переноса мы получили лишь косвенные доказательства того, что α -ККМ в отличие от свежесыведенных ККМ на ранних сроках дополнительно усиливают процесс аутофагии клеток печени. Известно, что аутофагии отводится также роль клеточной автономной защитной системы, которая в процессе деградации измененных клеточных белков высвобождает рецепторы, в том числе собственные DAMP_s (Damage-associated molecular patterns), что проявляется усилением иммуногенности ткани и более выраженным усилением ее клеточной инфильтрации, что мы и наблюдали в нашей работе (см. ниже).

Из литературы известно о появлении выраженной митотической активности гепатоцитов в печени крыс-реципиентов после введения им донорских

лимфоцитов селезенки. Отсутствие аналогичного эффекта в наших опытах после введения крысам-реципиентам ККМ мы связываем с существующей в организме клеточной специализацией. Она выражается в том, что при формировании регенерационного процесса ККМ, по-видимому, выполняют роль аккумулятора и преобразователя регенерационных сигналов, а исполнителями этого процесса уже выступают зрелые активно мигрирующие информированные лимфоциты периферической иммунной системы – лимфоциты из лимфоузлов и селезенки, но не мононуклеарные ККМ [1–4].

Анализ гистологических препаратов образцов печени и почек реципиентов (рис. 4) позволил во всех группах опытов с введением донорского материала на сроках 36, 48 часов только в печени, но не в почках, констатировать появление клеточной инфильтрации, которая была наиболее мощно выраженной в группах

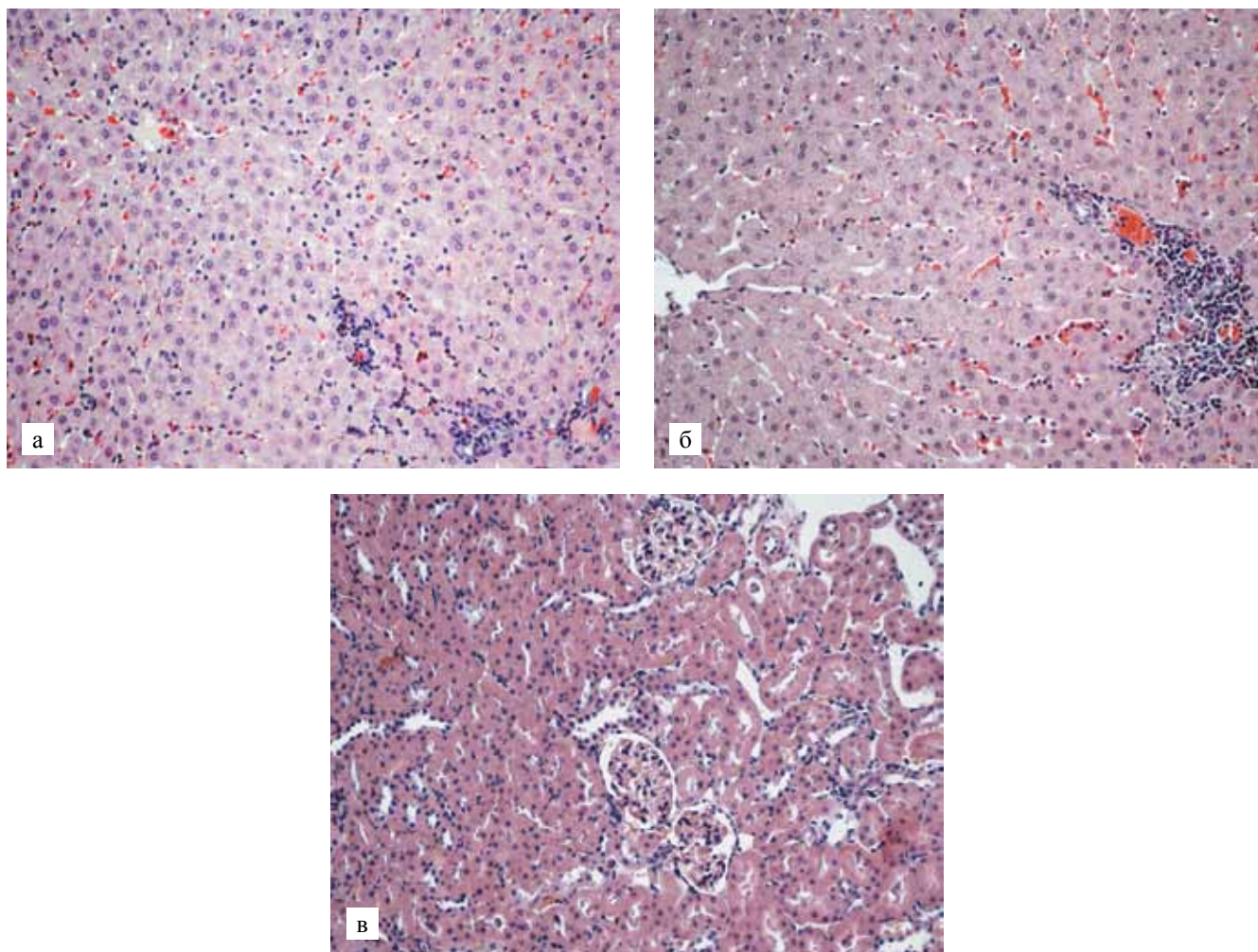


Рис. 4. Гистологическая структура ткани печени (а, б) и почки (в) на различных сроках после введения α -ККМ (группа 3): а – 36 часов, б – 48 часов, в – 48 часов; а, б – выраженная инфильтрация печени мононуклеарными клетками; в – отсутствие клеточной инфильтрации в ткани почек. Окраска гематоксилином и эозином $\times 200$

Fig. 4. Histological structure of the liver (A, B) and the kidney (C) tissue at various times after administration of α -BMC (group 3): а – 36 hours, б – 48 hours, в – 48 hours; а, б – pronounced infiltration of the liver by mononuclear cells; в – the absence of cellular infiltration in the kidney tissue. Staining with hematoxylin and eosin; magnification $\times 200$

с введением а-ККМ (группы 2 и 3), особенно в группе с применением клеток, хранившихся в растворе Кустодиол (НТК) (группа 3). Наиболее выраженная клеточная инфильтрация ткани печени в группе 3 по сравнению с группой 2 свидетельствовала как о дозозависимом регуляторном эффекте а-ККМ, так и о мощном усилении процессов аутофагии и раннего апоптоза при воздействии а-ККМ.

При введении а-ККМ, инкубированных в растворе Кустодиол через 36 и 48 часов, в печени здорового реципиента обнаруживались признаки, характерные для развития воспалительного процесса: наблюдалась инфильтрация клетками портальных трактов и синусоидов, а также диффузная активация синусоидных клеток, свидетельствующая, по-видимому, об активации ретикулоэндотелиальной системы (рис. 4, а, б). Следует отметить также, что среди клеток воспаления преобладали мононуклеары (преимущественно лимфоциты), обильно заполняющие просвет синусоидов. Через 24 и 72 часа после введения а-ККМ, хранившихся в ион-сбалансированном растворе Кустодиол, в печени реципиентов не возникало эффектов, определяемых на светооптическом уровне, и гистологическая картина паренхимы печени в целом не отличалась от таковой у интактного животного (рис. 5), что, по нашему мнению, свидетельствует об импульсном характере регуляторного воздействия а-ККМ на регенерационные процессы. Отсутствие клеточной инфильтрации в почках реципиента на всех исследуемых сроках после введения ККМ подтверждает адресную (тканеспецифическую) направленность регуляторного эффекта свежeweыделенных и а-ККМ.

Из ранее проведенных исследований [35] известно, что мононуклеарные апоптоз-индуцированные клетки обладают не провоспалительным, а иммуномодулирующим эффектом, выделяя в кровь иммунные медиаторы непосредственно или опосредованно через активацию макрофагов и дендритных клеток. Показано также, что введение апоптотических клеток ослабляет воспалительные реакции после их применения, в том числе и в печени при фульминантном гепатите [22], за счет усиления выработки в организме противовоспалительных цитокинов (TGF- β , IL-10) макрофагами и ингибирования продукции провоспалительных цитокинов (TGF- β , TNF- α) [20, 21, 36]. Кроме того, на печени было доказано существование взаимосвязи между прогрессирующим провоспалительным IL-1 β /TNF α -зависимым повреждением печени [37, 38] и сниженной способностью клеток печени к аутофагии, а также существование возможности повышения эффективности регенераторного процесса в печени за счет медикаментозной активации в ней процессов аутофагии [30, 31, 39, 40].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из полученных результатов следует:

- инкубация ККМ в растворе фосфатного буфера (PBS) и в ион-сбалансированном растворе Кустодиол (НТК) в течение 48 часов при $t = 4-6^\circ\text{C}$ оптимизирует накопление а-ККМ в состоянии раннего апоптоза;
- апоптоз-индуцированные и интактные ККМ в модели адоптивного переноса на ранних сроках после введения не индуцируют митотическую активность клеток печени;

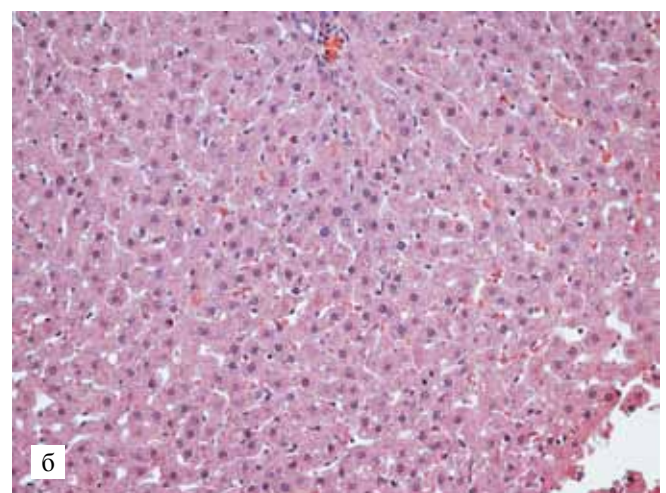
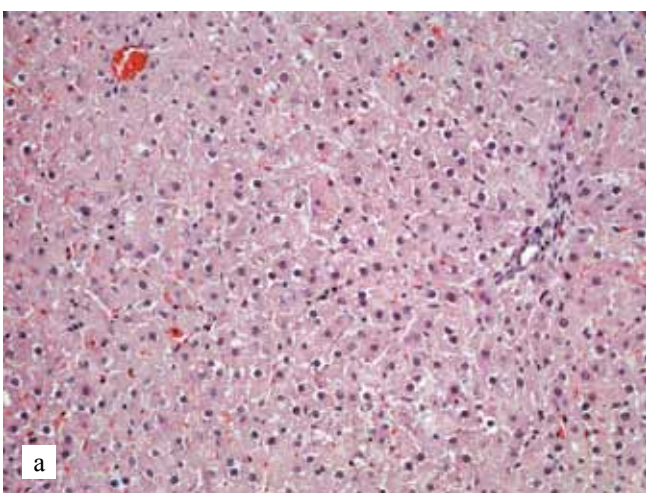


Рис. 5. Гистологическая структура ткани печени (а, б) на различных сроках после введения а-ККМ (группа 3): а – 24 часа, б – 72 часа. Клеточная инфильтрация печени мононуклеарными клетками практически отсутствует. Окраска гематоксилином и эозином $\times 200$

Fig. 5. Histological structure of liver tissue (a, б) at various times after the introduction of а-BMC (group 3): а – 24 hours, б – 72 hours. Cellular infiltration of the liver by mononuclear cells is practically absent. Staining with hematoxylin and eosin; magnification $\times 200$

- а-ККМ в модели адоптивного переноса повышают регенерационный потенциал клеток печени путем усиления в ней процессов аутофагии и направленной инфильтрации иммуномодулирующими (моноклеарными) клетками – переносчиками регенерационных сигналов;
- а-ККМ сохраняют способность адресной (тканеспецифической) передачи регуляторных сигналов, поддерживаемых в организме процессом аутофагии.

Все вышеизложенное дает нам основание считать, что а-ККМ в отличие от интактных ККМ создают в организме более прочный фундамент для выработки и осуществления адресной и эффективной регенерационной программы. В частности а-ККМ после ОРП за счет появления у них более мощного регуляторного стресс-индуцированного потенциала способствуют осуществлению адресной и более мощной активации процесса аутофагии в печени – универсального механизма регуляции процессов адаптации. За счет усиления аутофагии а-ККМ оказывают более выраженное иммуномодулирующее воздействие на иммунорегуляторные клетки, способствуя выработке ими противовоспалительных цитокинов и формированию эффективного регенераторного ответа в поврежденной печени.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Бабаева АГ, Геворкян НМ, Зотиков ЕА. Роль лимфоцитов в оперативном изменении программы развития тканей. М.: Изд. РАМН, 2009. 107. *Babaeva AG, Gevorgyan NM, Zotikov EA. Rol' limfocitov v operativnom izmenenii programmy' razvitiya tkanej. M.: Izd. RAMN, 2009. 107.*
2. Бабаева АГ, Тишевская НВ, Геворкян НМ. О морфогенетических свойствах РНК лимфоидных и стволовых клеток при восстановительных процессах. М.: Рос. акад. наук, Науч.-исслед. ин-т морфологии человека, 2016. 272. *Babaeva AG, Tishevskaya NV, Gevorgyan NM. O morfogeneticheskikh svojstvakh RNK limfoidnykh i stvolovykh kletok pri vosstanovitel'nykh processax. M.: Ros. akad. nauk, Nauch.-issled. in-t morfologii cheloveka, 2016. 272.*
3. Тишевская НВ, Бабаева АГ, Геворкян НМ. Роль лимфоцитарных РНК в межклеточном информационном обмене и регуляции регенеративных процессов. *Росс. физиол. журнал им. И.М. Сеченова.* 2016; 102 (11): 1280–1301. *Tishevskaya NV, Babaeva AG, Gevorgyan NM. Rol' limfocitarnykh RNK v mezhkлетochnom informacionnom obmene i regulyacii regenerativnykh processov. Ross.fiziol zhurnal im. I.M. Sechenova.* 2016; 102 (11): 1280–1301.
4. *Carvalho AB Quintannilha LF, Dias AS 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.
5. *Dai LJ, Li HY et al.* The therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on hepatic cirrhosis. *Stem Cell Res.* 2009; 2 (1): 16–25.
6. *Hodgkinson CP, Bareja A, Gomez JA, Dzau VJ.* Emerging concepts in paracrine mechanisms in regenerative cardiovascular medicine and biology. *Circ Res.* 2016; 118: 95–107.
7. *Mansour S, Roy DC, Bouchard V et al.* COMPARE-AMI trial: comparison of intracoronary injection of CD133+ bone marrow stem cells to placebo in patients after acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction: study rationale and design. *J Cardiovasc Transl Res.* 2010; 3: 153–159.
8. *Chen SL, Fang WW, Ye F et al.* Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2004; 94: 92–95.
9. *Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H et al.* Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature.* 2004; 428: 664–668.
10. *Mirotsoy M, Zhang Z, Deb A et al.* Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair. *Proc Natl Acad Sci.* 2007; 104: 1643–1648.
11. *Gnecchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ.* Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res.* 2008; 103: 1204–1219.
12. *Gnecchi M, Danieli P, Malpasso G, Ciuffreda MC.* Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cells in tissue repair. *Methods Mol Biol.* 2016; 1416: 123–146.
13. *Korf-Klingebiel M, Kempf T, Sauer T et al.* Bone marrow cells are a rich source of growth factors and cytokines: implications for cell therapy trials after myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2008; 29: 2851–2858.
14. *Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM.* Macrophages that have ingested apoptotic cells *in vitro* inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest.* 1998; 101: 890–898.
15. *Thum T, Bauersachs J, Poole-Wilson PA, Volk HD, Anker SD.* The dying stem cell hypothesis: immune modulation as a novel mechanism for progenitor cell therapy in cardiac muscle. *J Am Coll Cardiol.* 2005; 46: 1799–1802.
16. *Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR.* Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972; 26: 239–257.
17. *Stark MA, Huo Y, Burcin TL, Morris MA, Olson TS, Ley K.* Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity.* 2005; 22: 285–294.

18. Erwig LP, Henson PM. Immunological consequences of apoptotic cell phagocytosis. *Am J Pathol.* 2007; 171: 2–8.
19. Palmer E. Negative selection – clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3: 383–391.
20. Ren Y, Xie Y, Jiang G et al. Apoptotic cells protect mice against lipopolysaccharide-induced shock. *J Immunol.* 2008; 180: 4978–4985.
21. Gray M, Miles K, Salter D, Gray D, Savill J. Apoptotic cells protect mice from autoimmune inflammation by the induction of regulatory B cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104: 14080–14085.
22. Zhang M, Xu S, Han Y, Cao X. Apoptotic cells attenuate fulminant hepatitis by priming Kupffer cells to produce interleukin-10 through membrane-bound TGF- β . *Hepatology.* 2011; 53: 306–316.
23. Sirois I, Raymond MA, Brassard N et al. Caspase-3-dependent export of TCTP: a novel pathway for anti-apoptotic intercellular communication. *Cell Death Differ.* 2011; 18: 549–562.
24. Huang Q, Li F, Liu X et al. Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy. *Nat Med.* 2011; 17: 860–866.
25. Beer L, Zimmermann M, Mitterbauer A et al. Analysis of the secretome of apoptotic peripheral blood mononuclear cells: impact of released proteins and exosomes for tissue regeneration. *Sci Rep.* 2015; 5: 16662.
26. Ankersmit HJ, Hoetzenecker K, Diel W et al. Irradiated cultured apoptotic peripheral blood mononuclear cells regenerate infarcted myocardium. *Eur J Clin Invest.* 2009; 39: 445–456.
27. Beer L, Mildner M, Gyöngyösi M, Ankersmit HJ. Peripheral blood mononuclear cell secretome for tissue repair Apoptosis. 2016; 21: 1336–1353. doi 10.1007/s10495-016-1292-8.
28. Ельчанинов АВ, Фатхудинов ТХ. Регенерация печени млекопитающих: Межклеточные взаимодействия. М.: Наука, 2020. 126. *Yel'chaninov AV, Fatkhudinov TKh. Regeneratsiya pecheni mlekopitayushchikh: Mezhhkлетochnyye vzaimodeystviya.* М.: Nauka, 2020. 126.
29. Mougél F, Bonnefoy F, Kury-Paulin S et al. Intravenous infusion of donor apoptotic leukocytes before transplantation delays allogeneic islet graft rejection through regulatory T cells. *Diabetes Metab.* 2012; 38: 531–537.
30. Lin CW, Chen YS, Lin CC, Chen YJ, Lee PH, Kuo PL et al. Amiodarone as an autophagy promoter reduces liver injury and enhances liver regeneration and survival in mice after partial hepatectomy. *Sci Rep.* 2015 Oct 30; 5: 15807. doi: 10.1038/srep15807.
31. Cheng Y, Wang B, Zhou H, Dang S, Jin M, Shi Y et al. Autophagy is required for maintenance of liver progenitor cell functionality. *Cell Physiol Biochem.* 2015; 36 (3): 1163–1174.
32. Газизов ИМ, Гумерова АА, Киясов АП. Апоптоз в регенерационном гистогенезе печени после частичной гепатэктомии у крыс. *Гены и клетки.* 2015; 10 (3): 22–26. *Gazizov IM, Gumerova AA, Kiyasov AP. Apoptosis in regenerative histogenesis of the liver after partial hepatectomy in rats. Genes and cells.* 2015; 10 (3): 22–26.
33. Монголол ХП, Плеханов АН. Взаимосвязь апоптоза и регенерации печени при печеночной недостаточности после частичной гепатэктомии в эксперименте. *Acta Biomedica Scientifica.* 2009; 3: 203–206. *Mongolov KhP, Plekhanov AN. Interrelation of apoptosis and liver regeneration in hepatic insufficiency after partial hepatectomy in an experiment. Acta Biomedica Scientifica.* 2009; 3: 203–206.
34. Онищенко НА, Фоменко ЕВ, Никольская АО, Гоникова ЗЗ, Шагидулин МЮ, Балясин МВ и др. К механизму активации восстановительных процессов в печени при использовании общей РНК клеток костного мозга. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2020; XXII (3): 134–142. *Onishchenko NA, Fomenko YeV, Nikol'skaya AO, Gonikova ZZ, Shagidulin MYu, Balyasin MV i dr. K mekhanizmu aktivatsii vosstanovitel'nykh protsessov v pecheni pri ispol'zovanii obshchey RNK kletok kostnogo mozga. Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov.* 2020; XXII (3): 134–142.
35. Saas P, Daguindau E, Perruche S. Concise review: apoptotic cell-based therapies-rationale, preclinical results and future clinical developments. *Stem Cells.* 2016; 34 (6): 1464–1473.
36. Notley CA, Brown MA, Wright GP, Ehrenstein MR. Natural IgM is required for suppression of inflammatory arthritis by apoptotic cells. *J Immunol.* 2011; 186: 4967–4972.
37. Ruart M, Chavarria L, Campreciós G, Suárez-Herrera N, Montironi C, Guixé-Muntet S et al. Impaired endothelial autophagy promotes liver fibrosis by aggravating the oxidative stress response during acute liver injury. *J Hepatol.* 2019 Mar; 70 (3): 458–469. doi: 10.1016/j.jhep.2018.10.015.
38. Shen Y, Malik SA, Amir M, Kumar P, Cingolani F, Wen J et al. Decreased Hepatocyte Autophagy Leads to Synergistic IL-1 β and TNF Mouse Liver Injury and Inflammation. *Hepatology.* 2020 Aug; 72 (2): 595–608. doi: 10.1002/hep.31209.
39. Xue R, Yang J, Jia L, Zhu X, Wu J, Zhu Y, Meng Q. Mitofusin2, as a Protective Target in the Liver, Controls the Balance of Apoptosis and Autophagy in Acute-on-Chronic Liver Failure. *Front Pharmacol.* 2019 May 31; 10: 601. doi: 10.3389/fphar.2019.00601.
40. Lv H, Fan X, Wang L, Feng H, Ci X. Daphnetin alleviates lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced acute liver failure via the inhibition of NLRP3, MAPK and NF- κ B, and the induction of autophagy. *Int J Biol Macromol.* 2018 Nov; 119: 240–248. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.07.101.

Статья поступила в редакцию 23.07.2021 г.
The article was submitted to the journal on 23.07.2021