Печень

DOI: 10.16931/1995-5464.2018188-95

Влияние биологической комбинации (экстракт из растущей печени) на культуры клеток различного происхождения

Дюжева Т.Г.[1], Ковина М.В.[1], Платонова Л.В.[1], Люндуп А.В.[1], Куимов А.Н.[2], Клабуков И.Д.[1], Гао С.[3], Балясин М.В.[1], Гальперин Э.И.[1]*

[1] ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава РФ (Сеченовский Университет), Институт регенеративной медицины, Москва; 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, Российская Федерация

[2] НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского, МГУ имени М.В. Ломоносова; 119899, г. Москва, ул. Воробьевы Горы, МГУ, Российская Федерация

[3] Харбинский медицинский университет, Харбин, Китай

Цель. Изучить влияние экстракта, полученного из растущей печени, на жизнеспособность и пролиферативную активность различных типов клеток в культуре.

Материал и методы. Биологическая комбинация представляет собой экстракт, полученный из растущей печени по разработанной оригинальной методике. Исследовано влияние экстракта на следующие клеточные линии: гепатокарциному Huh7, мышиные L-фибробласты, мезенхимальные стволовые клетки костного мозга мыши. Жизнеспособность и пролиферативную активность оценивали по окрашиванию клеток трипановым синим и визуальному подсчету клеток при световой фазовоконтрастной микроскопии.

Результаты. Биологическая комбинация, полученная из растущей печени неонатального поросенка, дозозависимо защищает клетки гепатоцитарного происхождения от депривации фетальной сыворотки, в присутствии сыворотки стимулирует рост клеток. Высокая концентрация экстракта не приводит к ростовому аресту линии гепатоцитарного происхождения. В то же время экстракт является цитостатиком (или цитотоксином) для мышиных L-фибробластов. Выявлен ограниченный защитный эффект экстракта относительно депривации сыворотки при действии на стволовые клетки из костного мозга мыши.

Заключение. Результаты исследования позволяют рассматривать выделенный экстракт в качестве возможного регулятора репаративной регенерации печени, оказывающего защитный и/или стимулирующий эффект на клетки гепатоцитарного происхождения (Huh7), мезенхимальные стволовые клетки костного мозга мыши и цитостатический эффект на основные продуценты фиброзной ткани – фибробласты. Это является основанием для проведения дальнейших исследований.

Ключевые слова: *мезенхимальные стволовые клетки, фибробласты, бессывороточная среда, стимулятор регенерации, регенерация печени, ростовой арест.*

Ссылка для цитирования: Дюжева Т.Г., Ковина М.В., Платонова Л.В., Люндуп А.В., Куимов А.Н., Клабуков И.Д., Гао С., Балясин М.В., Гальперин Э.И. Влияние биологической комбинации (экстракт из растущей печени) на культуры клеток различного происхождения. *Анналы хирургической гепатологии.* 2018; 23 (1): 88–95. DOI: 10.16931/1995-5464.2018188-95.

Effect of Growing Liver Biological Set on Various Cellular Cultures

Dyuzheva T.G.[1], Kovina M.V.[1], Platonova L.V.[1], Lyundup A.V.[1], Kuimov A.N.[2], Klabukov I.D.[1], Gao Xu[3], Balyasin M.V.[1], Galperin E.I.[1]*

[1] Sechenov First Moscow State Medical University of Healthcare Ministry of the Russian Federation, Regenerative Medicine Institute; 8-2, Trubetskaya str., Moscow 119991, Russian Federation

[2] Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University: Vorobyovy Gory, MGU, Moscow, 119899, Russian Federation

[3] Harbin Medical University, Harbin, China

Aim. To analyze the effect of growing liver biological set on viability and proliferative activity of various cellular cultures in vitro.

Material and Methods. The biological combination is an extract from the growing liver obtained by using of original technique. We have assessed extract's effect on the following cellular lines: hepatic carcinoma Huh7, L-fibroblasts of mice, murine bone marrow mesenchymal stem cells. Viability and proliferative activity were assessed by staining the cells with trypan blue and visual counting of cells under phase contrast microscopy.

Result. Biological combination from neonatal piglet's growing liver dose-dependently protects hepatocyte-like cells from deprivation of fetal serum and stimulates cellular growth in presence of serum. High concentrations of HRS do not lead to growth arrest of the Huh7 cells. At the same time, it is a cytostatic (or cytotoxic) for murine L-fibroblasts. Limited protective effect of the combination on the deprivation of serum when exposed to bone marrow stem cells was revealed.

Conclusion. Our data show that the extract may be considered as an important regulator of reparative regeneration of liver with protective and/or stimulating effect on mesenchymal stem and hepatic-like cells and cytostatic effect on fibroblasts. So, further trials are necessary.

Keywords: *mesenchymal stem cells, fibroblasts, serum-free medium, regeneration stimulator, hepatic regeneration, growing arrest.*

For citation: Dyuzheva T.G., Kovina M.V., Platonova L.V., Lyundup A.V., Kuimov A.N., Klabukov I.D., Gao Xu, Balyasin M.V., Galperin E.I. Effect of growing liver biological set on various cellular cultures. *Annaly khirurgicheskoy gepatologii = Annals of HPB surgery*. 2018; 23 (1): 88–95. (In Russian). DOI: 10.16931/1995-5464.2018188-95.

Сведения об авторах [Authors info]

Дюжева Татьяна Геннадьевна – доктор мед. наук, профессор, заведующая отделом регенеративной хирургии печени и поджелудочной железы Института регенеративной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава РФ (Сеченовский Университет).

Ковина Марина Валентиновна – канд. биол. наук, старший научный сотрудник отдела регенеративной хирургии печени и поджелудочной железы Института регенеративной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава РФ (Сеченовский Университет).

Платонова Любовь Владимировна – канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник отдела регенеративной хирургии печени и поджелудочной железы Института регенеративной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава РФ (Сеченовский Университет).

Люндуп Алексей Валерьевич – канд. мед. наук, заведующий отделом передовых клеточных технологий Института регенеративной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава РФ (Сеченовский Университет).

Куимов Александр Николаевич – канд. биол. наук, старший научный сотрудник НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова.

Клабуков Илья Дмитриевич – научный сотрудник отдела передовых клеточных технологий Института регенеративной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава РФ (Сеченовский Университет).

Гао Сей – доктор медицины, профессор, Харбинский медицинский университет.

Балясин Максим Витальевич – лаборант отдела передовых клеточных технологий Института регенеративной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава РФ (Сеченовский Университет).

Гальперин Эдуард Израилевич – доктор мед. наук, профессор, почетный профессор ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава РФ (Сеченовский Университет).

Для корреспонденции*: Ковина Марина Валентиновна – 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, Институт регенеративной медицины, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Российская Федерация. Тел.: 8-963-623-90-42. E-mail: gershi2001@yahoo.com

Dyuzheva Tatiana Gennadyevna – Doct. of Med. Sci., Professor, Head of Regenerative Liver and Pancreatic Surgery Department, Regenerative Medicine Institute, Sechenov First Moscow State Medical University.

Kovina Marina Valentinovna – Cand. of Biol. Sci., Senior Researcher of Regenerative Liver and Pancreatic Surgery Department, Regenerative Medicine Institute, Sechenov First Moscow State Medical University.

Platonova Lubov Vladimirovna – Cand. of Biol. Sci., Leading Researcher of Regenerative Liver and Pancreatic Surgery Department, Regenerative Medicine Institute, Sechenov First Moscow State Medical University.

Lyundup Aleksey Valeryevich – Cand. of Med. Sci., Head of Advanced Cell Technologies Department of Regenerative Medicine Institute, Sechenov First Moscow State Medical University.

Kuimov Aleksandr Nikolaevich – Cand. of Biol. Sci., Senior Researcher of Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University.

Klabukov Ilya Dmitrievich – Researcher of Advanced Cell Technologies Department, Sechenov First Moscow State Medical University.

Gao Xu – PhD, Professor, Harbin Medical University.

Balyasin Maxim Vitalyevich – laboratory assistant of Advanced Cell Technologies Department, Sechenov First Moscow State Medical University.

Galperin Eduard Israilevich – Doct. of Med. Sci., Professor, Honorary Professor of Sechenov First Moscow State Medical University.

For correspondence*: Kovina Marina Valentinovna – 8-2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Institute of Regenerative Medicine, Sechenov First Moscow State Medical University. Phone: +7-963-623-90-42. E-mail: gershi2001@yahoo.com

Введение

Современные технологии позволяют проводить обширные резекции печени, однако недостаточный функциональный объем остающейся паренхимы печени является причиной развития пострезекционной печеночной недостаточности. Для профилактики послеоперационной недостаточности печени разработан способ воздействия, направленный на увеличение массы остающейся печени, – эмболизация воротной вены, которая осуществляется до проведения резекции печени. Продолжаются исследования механизмов регенерации после эмболизации воротной вены, резекции печени, при заболеваниях желчных протоков [1–4] с целью возможного воздействия на пролиферацию гепатоцитов.

Сложность механизмов регенерации печени, большое число участников процесса не позволяют использовать какой-то один из известных факторов роста для увеличения пролиферации гепатоцитов. В 1975 г. LeBreque показал, что для повышения регенерации печени возможно использовать естественный набор, полученный из регенерирующей печени после удаления 70% органа, и назвал его HSS (hepatic stimulator substance) [5]. Мы разработали оригинальную методику получения экстракта из регенерирующей и растущей печени модельных животных, назвав его hepatic regeneration set (HRS), и показали возможность снижения цитолиза на моделях токсического повреждения печени введением тиоацетамида [6, 7].

Целью исследования было изучение влияния экстракта, полученного из растущей печени, на жизнеспособность и пролиферативную активность различных типов клеток в культуре.

Материал и методы

Получение HRS. Для получения HRS использовали технологию, подробно описанную в патенте Э.И. Гальперина и соавт. [8]. Полученный экстракт ткани печени хранили при температуре –65–70 °С. Перед работой экстракт стерилизовали фильтрованием через 0,2 мкм фильтр. Исходный экстракт имел концентрацию 3,34 мг сухого веса в 1 мл. Для культивирования клеток экстракт разводили культуральной средой в 10 или 100 раз (10% или 1% HRS соответственно).

Клетки. Использовали гепатокарциному человека Huh7 (Thermo Fisher Scientific), мышиные фибробласты линии L (ATCC® CRL2648™) и мезенхимальные стволовые клетки (МСК) костного мозга мыши, выделение которых проводилось по описанному ранее в литературе методу [9].

Культивирование и инкубацию культур клеток с HRS проводили в соответствии с ранее опубликованным протоколом [9, 10] следующим образом. Клетки Huh7 выращивали в среде DMEM с 10% фетальной бычьей сывороткой (ФБС). Первичные культуры клеток грызунов поддерживали в среде DMEM с низкой концентрацией глюкозы и 10% ФБС. Среду меняли дважды в неделю. При необходимости клетки пересевали 0,25% раствором трипсина в ЭДТА.

Рассев клеток на 24 луночные планшеты осуществляли из расчета 15–20 тыс. клеток на лунку; через 4–8 ч стандартную питательную среду заменяли на бессывороточную среду (SD), среду с разными концентрациями HRS либо стандартную среду с 10% ФБС. Инкубировали клетки в перечисленных средах в течение 2 нед, меняя среду дважды в неделю. Через 2 нед инкубации клетки отмывали от HRS и добавляли среду с 10% ФБС либо проводили тестирование жизнеспособности с трипановым синим. В параллельных лунках определяли количество клеток.

Жизнеспособность и пролиферативная активность различных клеток в культуре. Жизнеспособность и пролиферативную активность оценивали по окрашиванию клеток трипановым синим после трипсинизации и по визуальному подсчету клеток при световой фазовоконтрастной микроскопии.

Количественный мониторинг динамики пролиферации клеток. Рост клеток регистрировали по усовершенствованной нами технологии визуального подсчета количества клеток на единицу площади [11]. Подсчитывали количество клеток в 1/4 поля зрения микроскопа при увеличении 1 : 200. На этом же увеличении в поле зрения микроскопа помещали камеру Горяева с известными размерами квадратов и исходя из соотношения размеров квадратов Горяева с диагональю поля зрения рассчитывали площадь поля зрения $S_{пз}$, что позволяет определять плотность клеток на единицу площади. Поскольку обычно клетки лежат неравномерно, среднюю конфлюэнтность и(или) общее количество клеток оценивали по нескольким полям зрения в различных участках ячейки и по параллельным ячейкам и усредняли. Коэффициент вариации количества клеток при визуальном подсчете между ячейками не превышал ±15% от среднего. При достижении полной конфлюэнтности исходной ячейки клетки пересевали с разведением, учитывая которое продолжали расчет динамики пролиферации на дочерних ячейках как % от емкости исходной ячейки. Для каждой концентрации тестируемого экстракта клетки считали не менее чем на трех параллельных исходных ячейках.

Статистика. Анализ данных проводили в статистической программе Graphpad Prism версии 7.00. Различия между группами выявляли при помощи двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями (two-way ANOVA RM), среднее различие (main effect) между группами рассчитывали с поправкой на

множественные сравнения по методу Тьюки. Данные на графиках представлены как среднее значение ± стандартное отклонение, разница между исследуемыми группами – как среднее различие ± стандартная ошибка. Соотношение жизнеспособных и нежизнеспособных клеток при проведении теста с трипановым синим на линии Huh7 проверяли на нормальное распределение методом Шапиро–Уилка, после чего проводили однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с последующим t-тестом с поправкой Тьюки. Различия между группами считали достоверными при значении $p < 0,05$.

Результаты

Влияние HRS на клетки гепатоцитарного происхождения. На рис. 1 представлены результаты мониторинга методом визуального подсчета количества клеток гепатоцитарной линии Huh7 в течение 2 нед инкубации в присутствии HRS (в концентрации 1% – зеленая и 10% – красная линии). В контрольных экспериментах клетки инкубировали в бессывороточной среде (черная линия) и в стандартной среде с ФБС (голубая линия). Видно, что контрольные клетки Huh7 в отсутствие сыворотки погибают после инкубации в бессывороточной среде (черная линия рис. 1). HRS защищает Huh7 от гибели в бессывороточной среде (красная и зеленая кривые), так как при дальнейшем добавлении сыворотки (обозначено стрелкой) наблюдается активация роста клеток, значительно более быстрая в ячейках, где клетки преинкубировались с HRS (вставка рис. 1). Причем преинкубация с 10% HRS способствовала более быстрому восстановлению роста, чем с 1% HRS (сравните красную и зеленую кривые с 15-го дня). Таким образом, HRS дозозависимо защищает клетки гепатоцитарного происхождения от угнетающего влияния бессывороточной среды и стимулирует пролиферацию этих клеток при снятии воздействия SD. На рис. 2 показано влияние HRS на жизнеспособность упомянутой выше клеточной линии, оцененную при помощи трипанового синего. Этот тест подтвердил защиту клеток гепатоцитарного происхождения экстрактом HRS от угнетающего действия депривации сыворотки. В присутствии ФБС обнаружено 82 ± 2,9% жизнеспособных клеток, в бессывороточной среде – 14,4 ± 5,2%, в присутствии HRS – 66 ± ± 8,8% клеток.

Влияние HRS на мышиные фибробласты линии L На рис. 3 представлены результаты мониторинга методом визуального подсчета количества фибробластов в течение 2 нед инкубации в бессывороточной среде (черная кривая) и в присутствии HRS (в концентрации 1% зеленая – и 10% – красная линии). В сывороточном контроле (голубая линия) через 2 нед к стандартной

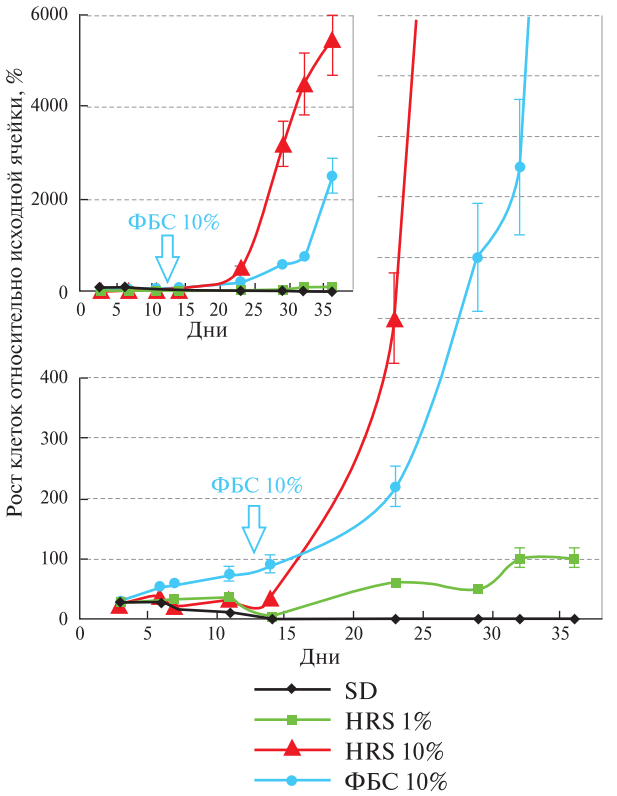

Рис. 1. Диаграмма. Влияние HRS на рост гепатокарциномы человека Huh7 в присутствии и в отсутствие (SD) сыворотки. Визуальный счет по 3–4 полям зрения. Через 2 нед во всех ячейках стандартная среда с 10% ФБС (стрелка). На вставке: уменьшенный масштаб графика для иллюстрации динамики пролиферации на отдаленных пассажах.

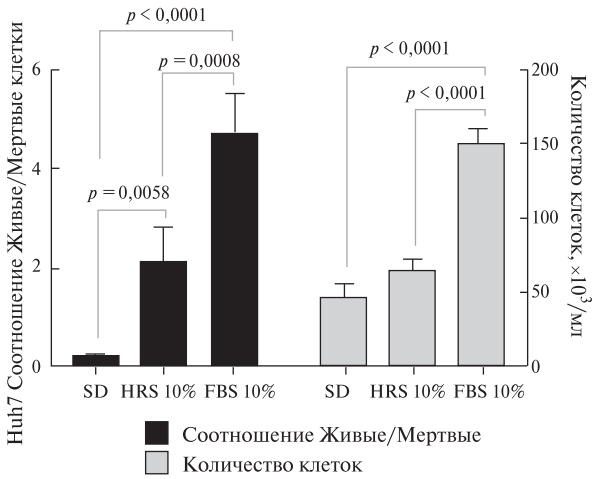

Рис. 2. Диаграмма. Исключение трипанового синего гепатокарциномой Huh7: соотношение % жизнеспособных к погибшим клеткам (черный цвет) после 2-недельной инкубации в различных средах, общее число клеток (серый цвет).

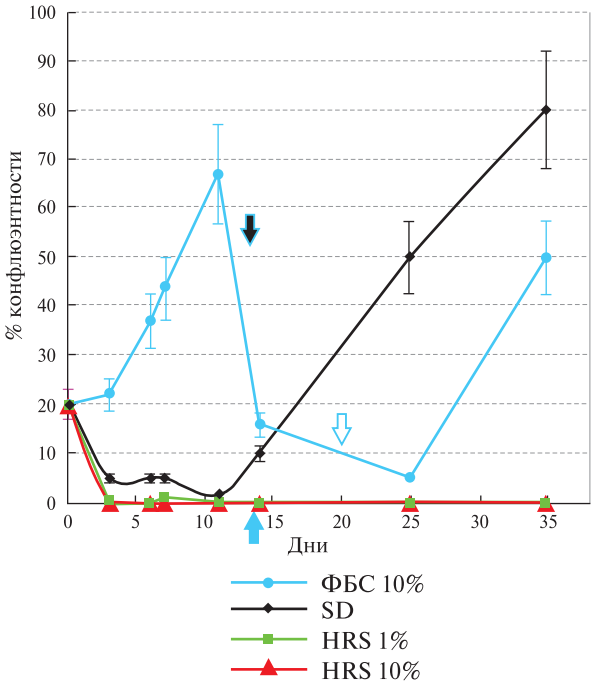

Рис. 3. Диаграмма. Влияние HRS на рост L-фибробластов в присутствии и в отсутствие сыворотки. Визуальный счет по 3–4 полям зрения. Через 2 нед (голубая стрелка) все типы бессывороточных сред заменены на стандартную среду (10% ФБС), а сывороточная среда (голубая кривая) заменена на сывороточную с добавлением HRS (10% ФБС +10%, HRS, черная стрелка). С 20-го дня везде – стандартная среда (10% ФБС, белая стрелка).

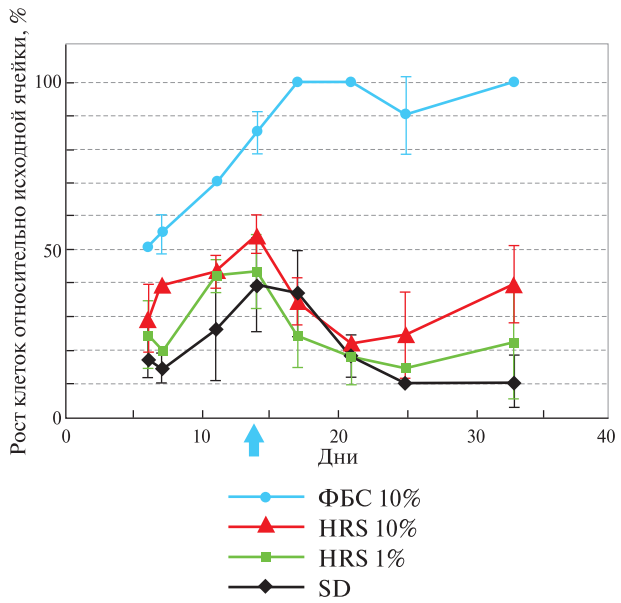

Рис. 4. Диаграмма. Влияние HRS на рост МСК костного мозга мыши в присутствии и в отсутствие сыворотки. Визуальный счет по 3–4 полям зрения. Через 2 нед во всех ячейках стандартная среда с 10% ФБС (стрелка).

среде был добавлен 10% HRS (обозначено стрелкой), а на 20-й день среду вновь заменили на стандартную с 10% ФБС (следующая стрелка).

При этом оказалось, что бессывороточная среда, подобно действию на Huh7, угнетает фибробласты (черная кривая), однако некоторая доля L-клеток в отличие от Huh7 оказалась способной к восстановлению пролиферации при последующем добавлении сыворотки. HRS, независимо от концентрации, не только не защищает L-клетки от угнетающего действия SD, как это было в случае Huh7, но и усугубляет его. Негативное действие HRS на фибробласты наблюдалось даже в присутствии 10% ФБС (голубая кривая после момента добавления HRS через 2 нед инкубации с ФБС), однако оно было обратимым: после смены на 20-й день HRS-содержащей среды на 10% ФБС отмечено усиление пролиферации клеток.

Влияние HRS на МСК костного мозга мыши

На рис. 4 представлены результаты мониторинга методом визуального подсчета количества клеток МСК в течение 2 нед инкубации в присутствии HRS (в концентрации 1% – зеленая и 10% – красная линии). В контрольных экспериментах клетки инкубировали в бессывороточной среде (черная линия) и в стандартной среде с ФБС (голубая линия). Через 2 нед везде сменили среду на стандартную (10% ФБС). В контроле, подобно действию на L-фибробласты, бессывороточная среда обратимо угнетала МСК (различие между черной и голубой кривыми статистически значительно, $p < 0{,}0001$), некоторая доля клеток восстанавливала пролиферацию после добавления 10% ФБС. Однако HRS противодействовал угнетающему действию SD, как это было и при исследовании культуры Huh7. А именно, в течение и сразу после инкубации в бессывороточной среде (между 6-ми и 33-ми сутками), в присутствии 10% HRS в среднем определялось на 14,3 ± 3,4% больше клеток, чем в его отсутствие, различие достоверно ($p = 0{,}0065$). В то же время при уменьшении концентрации HRS до 1% защитный эффект падал: 4,3 ± 3,4%; $p = 0{,}6024$.

Обсуждение

Изучение механизмов фиброгенеза при стимуляции регенерации печени является фундаментальной научной проблемой. В настоящее время регенерацию печени разделяют на репаративную (восстановление паренхиматозных клеток – гепатоцитов) и фиброзную (развитие фиброзной соединительной ткани в печени). Кроме того, регенерацию печени связывают не только с делением печеночной клетки гепатоцита (что наблюдается при удалении части здоровой печени), но и с трансформацией стволовых клеток (не только стромальных, но и регионарных:

овальные клетки, звездчатые клетки и др.), которая во многом определяет вектор регенерации – репаративный или фиброзный. Последний наблюдается при регенерации в условиях хронического воспаления [12, 13]. Возникновение репаративной или фиброзной регенерации во многом связано с клеточным и цитокиновым окружением, доминирующим при повреждении паренхимы печени. Именно воспалительные цитокины, факторы роста и другие пептиды образуют микроокружение, которое благоприятствует репаративной регенерации, а не трансформации звездчатых клеток в миофибробласты, продуцирующие коллаген.

Ранее нами было показано, что многокомпонентный экстракт, полученный из растущей печени (HRS) по оригинальной методике [8], вызывает снижение цитолиза на моделях токсического повреждения печени тиоацетамидом [7]. Являясь многокомпонентным по составу, HRS может создать окружение в поврежденном очаге печени, способствующее репаративной регенерации. Наш подход предполагает, что именно многофакторное окружение стволовых клеток определяет успех регенерации. Использование естественного набора индукторов регенерации, содержащихся в HRS, возможно, создаст предпосылки к инициации репаративной регенерации и трансформации стволовых клеток в сторону гепатоцитов, а не активации непаренхиматозных клеток в сторону фиброзных изменений.

В данной работе моделью для изучения эффектов HRS *in vitro* нами была выбрана бессывороточная среда, как достаточно мягкий, но универсальный повреждающий фактор. Известно, что большинство известных культур клеток не могут расти и даже выживать без гуморальных факторов в среде, полностью адекватной по содержанию питательных веществ. Клетки многоклеточного организма должны получать сигналы об их расположении в правильном тканевом окружении, называемые факторами роста. В противном случае они включают апоптоз [14]. Поэтому в лабораторных условиях для поддержания жизнеспособности клеток в среду добавляют факторы роста, либо высокоочищенные, либо в составе сыворотки эмбриональной крови, богатой такими гуморальными факторами. Полученные в представленной работе данные свидетельствуют о том, что HRS в бессывороточной среде по-разному влияет на жизнеспособность клеток в культуре: способен поддерживать жизнеспособность клеток гепатоцитарного происхождения (эффект является дозозависимым), в то же время оказывает цитостатический эффект на культуру фибробластов.

Известно, что в регенерации здоровой печени главную роль играют гепатоциты, в то время как при хронических заболеваниях печени помимо гепатоцитов существенную роль играют непаренхиматозные клетки, которые вызывают патологическую фиброзирующую форму регенерации. В последние годы, согласно литературным источникам, вновь появился интерес к изучению многокомпонентных регуляторов регенерации, в частности HSS. Имеются данные об антифиброзном действии HSS [15], что очень важно в регенерации не здоровой, а фиброзно измененной печени. Китайскими исследователями получены данные о роли микро-РНК в развитии фиброза. Определен путь, регулирующий фиброз печени, связанный с ингибированием активации звездчатых клеток. Показано, что miR-483-5p и miR-483-3p могут участвовать в подавлении фиброгенеза *in vivo* и *in vitro* [16].

Одним из активных компонентов HSS является augmenter of liver regeneration (ALR). При его недостатке возникает фиброз и цирроз печени на фоне приема алкоголя, так как критическим образом нарушается метаболизм алкоголя, обмен железа, геном митохондрий [17]. Повышенная же экспрессия ALR приводит к ингибированию зависимого от митохондрии апоптоза клеток печени за счет супрессии продукции активных форм кислорода и поддержания активности комплексов дыхательной цепи в митохондриях [18]. Также показано, что при повышенной экспрессии ALR в культуре клеток гепатомы BEL-7402 происходит предотвращение гибели клеток, вызванной стрессом эндоплазматического ретикулума (ЭР-стресс). В результате данного исследования был выявлен протективный эффект ALR от апоптоза, вызванного ЭР-стрессом, и данный эффект может быть связан с удалением активных форм кислорода и восстановлением активности Ca^{+2}АТФазы саркоплазматического ретикулума [19].

Заключение

Полученный оригинальным методом HRS оказывает различное воздействие на клетки гепатоцитарного происхождения (Huh7), L-фибробласты и стволовые клетки из костного мозга мыши. HRS дозозависимо защищает клетки Huh7 от депривации сыворотки. В то же время HRS в широком диапазоне концентраций является необратимым цитостатиком (или цитотоксином) для мышиных фибробластов линии L в бессывороточной среде и обратимым – в сывороточной. На стволовых клетках костного мозга мыши выявлен защитный эффект HRS относительно депривации сыворотки и повышение пролиферативной активности в оптимальной среде с 10% ФБС. Таким образом, результаты проведенного нами совместного исследования по изучению влияния HRS на различные культуры клеток могут дополнить комплексный механизм действия HRS при различных повреж-

дениях печени многофакторным протективным действием на клетки печени и их отдельные органеллы, противовоспалительным действием, антиоксидативным эффектом, антифибротическим действием. Это является основанием для проведения дальнейших исследований.

Источник финансирования

Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант №16-54-53090).

Список литературы

1. Kim R.D., Kim J.S., Watanabe G., Mohuczy D., Behrns K.E. Liver regeneration and the atrophy-hypertrophy complex. *Semin. Intervent. Radiol.* 2008; 25 (2): 92–103. DOI: 10.1055/s-2008-1076679.
2. Fürst G., Schulte am Esch J., Poll L.W., Hosch S.B., Fritz L.B., Klein M., Godehardt E., Krieg A., Wecker B., Stoldt V., Stockschläder M., Eisenberger C.F., Mödder U., Knoefel W.T. Portal vein embolization and autologous CD133+ bone marrow stem cells for liver regeneration: initial experience. *Radiology.* 2007; 243 (1): 171–179. DOI: 10.1148/radiol.2431060625.
3. Serenari M., Cescon M., Cucchetti A., Pinna A.D. Liver function impairment in liver transplantation and after extended hepatectomy. *World J. Gastroenterol.* 2013; 19 (44): 7922–7929. DOI: 10.3748/wjg.v19.i44.7922.
4. Moris D., Vernadakis S., Papalampros A., Vailas M., Dimitrokallis N., Petrou A., Dimitroulis D. Mechanistic insights of rapid liver regeneration after associating liver partition and portal vein ligation for stage hepatectomy. *World J. Gastroenterol.* 2016; 22 (33): 7613–7624. DOI: 10.3748/wjg.v22.i33.7613.
5. LaBrecque D.R., Pesch L.A. Preparation and partial characterization of hepatic regenerative stimulator substance (SS) from rat liver. *J. Physiol.* 1975; 248 (2): 273–284. DOI: 10.1113/jphysiol.1975.sp010973.
6. Gal'perin E.I., Platonova L.V., Shono N.I., Chevokin A.Y., Sakevarashvili G.R., Abakumova O.Y., Tsvetkova T.A., Kondakova L.I. Thermostable hepatocyte growth factor and energy metabolism in rats after partial hepatectomy. *Bull. Exp. Biol. Med.* 1999; 127 (1): 47–49. DOI: 10.1007/BF02432798.
7. Гальперин Э.И., Атауллаханов Р.И., Дюжева Т.Г., Платонова Л.В., Мельникова Т.М., Монаков М.Ю., Дудченко А.М., Люндуп А.В., Клабуков И.Д. Возможности биологической комбинации, полученной из растущей печени, для ее восстановления при токсическом повреждении (экспериментальное исследование). Биомедицинская химия. 2017; 63 (5): 440–446. DOI: 10.18097/PBMC20176305440.
8. Гальперин Э.И., Дюжева Т.Г., Абакумова О.Ю., Платонова Л.В. Способ получения вещества, стимулирующего регенерацию поврежденной печени. Патент РФ на изобретение №2548750 /17.02.2014. Бюл. №11-2015.
9. Rasulov M.F., Vasilchenkov A.V., Onishchenko N.A., Krasheninnikov M.E., Kravchenko V.I., Gorshenin T.L., Pidtsan R.E., Potapov I.V. First experience in the use of bone marrow mesenchymal stem cells for the treatment of a patient with deep skin burns. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2005; 139 (1): 141–144. DOI: 10.1007/s10517-005-0232-3.
10. Куимов А.Н., Жожикашвили А.С., Никифорова А.И., Манских В.Н., Платонова Л.В., Шоно Н.И., Савицкая Е.Е., Батин М.А., Дюжева Т.Г. Влияние экстракта из растущей печени на пролиферацию гепатоцитов (экспериментальное исследование). Анналы хирургической гепатологии. 2012; 17 (4): 66–74.
11. Chen J., Larochelle A., Fricker S., Bridger G., Dunbar C.E., Abkowitz J.L. Mobilization as a preparative regimen for hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2006; 107 (9): 3764–3771.
12. Tanaka M., Miyajima A. Liver regeneration and fibrosis after inflammation. *Inflamm. Regen.* 2016; 36: 19. DOI: 10.1186/s41232-016-0025-2.
13. Michalopoulos G.K. Liver regeneration after partial hepatectomy. Critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am. J. Pathol.* 2010; 176 (1): 2–13. DOI: 10.2353/ajpath.2010.090675.
14. Kiess W., Gallaher B. Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *Eur. J. Endocrinol.* 1998; 138 (5): 482–491.
15. Yi X., Song M., Yuan Y., Zhang X., Chen W., Li J., Tong M., Liu G., You S., Kong X. Hepatic stimulator substance alleviates toxin-induced and immune-mediated liver injury and fibrosis in rats. *Dig. Dis. Sci.* 2012; 57 (8): 2079–2087. DOI: 10.1007/s10620-012-2168-6.
16. Li F., Ma N., Zhao R., Wu G., Zhang Y., Qiao Y., Han D., Xu Y., Xiang Y., Yan B., Jin J., Lv G., Wang L., Xu C., Gao X., Luo S. Overexpression of miR-483-5p/3p cooperate to inhibit mouse liver fibrosis by suppressing the TGF-β stimulated HSCs in transgenic mice. *J. Cell. Mol. Med.* 2014; 18 (6): 966–974. DOI: 10.1111/jcmm.12293.
17. Kumar S., Wang J., Rani R., Gandhi C.R. Hepatic deficiency of augmenter of liver regeneration exacerbates alcohol-induced liver injury and promotes fibrosis in mice. *PLoS One.* 2016; 11 (1): e0147864. DOI: 10.1371/journal.pone.0147864.
18. Jiang S.J., Li W., An W. Adenoviral gene transfer of hepatic stimulator substance confers resistance against hepatic ischemia-reperfusion injury by improving mitochondrial function. *Hum. Gene Ther.* 2013; 24 (4): 443–456. DOI: 10.1089/hum.2012.219.
19. Zhang J., Li Y., Jiang S., Yu H., An W. Enhanced endoplasmic reticulum SERCA activity by overexpression of hepatic stimulator substance gene prevents hepatic cells from ER stressinduced apoptosis. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2014; 306 (3): 279–290. DOI: 10.1152/ajpcell.00117.2013.

References

1. Kim R.D., Kim J.S., Watanabe G., Mohuczy D., Behrns K.E. Liver regeneration and the atrophy-hypertrophy complex. *Semin. Intervent. Radiol.* 2008; 25 (2): 92–103. DOI: 10.1055/s-2008-1076679.
2. Fürst G., Schulte am Esch J., Poll L.W., Hosch S.B., Fritz L.B., Klein M., Godehardt E., Krieg A., Wecker B., Stoldt V., Stockschläder M., Eisenberger C.F., Mödder U., Knoefel W.T. Portal vein embolization and autologous CD133+ bone marrow stem cells for liver regeneration: initial experience. *Radiology.* 2007; 243 (1): 171–179. DOI: 10.1148/radiol.2431060625.
3. Serenari M., Cescon M., Cucchetti A., Pinna A.D. Liver function impairment in liver transplantation and after extended hepatectomy. *World J. Gastroenterol.* 2013; 19 (44): 7922–7929. DOI: 10.3748/wjg.v19.i44.7922.
4. Moris D., Vernadakis S., Papalampros A., Vailas M., Dimitrokallis N., Petrou A., Dimitroulis D. Mechanistic insights of rapid liver regeneration after associating liver partition and portal vein ligation for stage hepatectomy. *World J. Gastroenterol.* 2016; 22 (33): 7613–7624. DOI: 10.3748/wjg.v22.i33.7613.
5. LaBrecque D.R., Pesch L.A. Preparation and partial characterization of hepatic regenerative stimulator substance

(SS) from rat liver. *J. Physiol.* 1975; 248 (2): 273–284. DOI: 10.1113/jphysiol.1975.sp010973.
6. Gal'perin E.I., Platonova L.V., Shono N.I., Chevokin A.Y., Sakevarashvili G.R., Abakumova O.Y., Tsvetkova T.A., Kondakova L.I. Thermostable hepatocyte growth factor and energy metabolism in rats after partial hepatectomy. *Bull. Exp. Biol. Med.* 1999; 127 (1): 47–49. DOI: 10.1007/BF02432798.
7. Galperin E.I., Ataullakhanov R.I., Dyuzheva T.G., Platonova L.V., Melnikova T.M., Monakov M.Yu., Dudchenko A.M., Lyundup A.V., Klabukov I.D. Possible use of the growing liver biological set for hepatic recovery after toxic damage (an experimental study). *Biomeditsinskaya khimiya*. 2017; 63 (5): 440–446. (In Russian)
8. Galperin E.I., Dyuzheva T.G., Abakumova O.Yu., Platonova L.V. *Sposob poluchenija veshhestva, stimulirujushhego regeneraciju povrezhdennoj pecheni* [Method for producing substance stimilating injured liver repair]. Patent RUS №2548750/17.02.2014. Byul. №11-2015. (In Russian)
9. Rasulov M.F., Vasilchenkov A.V., Onishchenko N.A., Krasheninnikov M.E., Kravchenko V.I., Gorshenin T.L., Pidtsan R.E., Potapov I.V. First experience in the use of bone marrow mesenchymal stem cells for the treatment of a patient with deep skin burns. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2005; 139 (1): 141–144. DOI: 10.1007/s10517-005-0232-3.
10. Kuimov A.N., Zhozhikashvili A.S., Nikiforova A.I., Manskikh V.N., Platonova L.V., Shono N.I., Savitskaya E.E., Batin M.A., Dyuzheva T.G. Influence of the growing liver extract on the hepatocyte proliferation (experimental investigation). *Annaly khirurgicheskoy gepatologii = Annals of HPB surgery*. 2012; 17 (4): 66–74. (In Russian)
11. Chen J., Larochelle A., Fricker S., Bridger G., Dunbar C.E., Abkowitz J.L. Mobilization as a preparative regimen for hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2006; 107 (9): 3764–3771.
12. Tanaka M., Miyajima A. Liver regeneration and fibrosis after inflammation. *Inflamm. Regen*. 2016; 36: 19. DOI: 10.1186/s41232-016-0025-2.
13. Michalopoulos G.K. Liver regeneration after partial hepatectomy. Critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am. J. Pathol.* 2010; 176 (1): 2–13. DOI: 10.2353/ajpath.2010.090675.
14. Kiess W., Gallaher B. Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *Eur. J. Endocrinol.* 1998; 138 (5): 482–491.
15. Yi X., Song M., Yuan Y., Zhang X., Chen W., Li J., Tong M., Liu G., You S., Kong X. Hepatic stimulator substance alleviates toxin-induced and immune-mediated liver injury and fibrosis in rats. *Dig. Dis. Sci*. 2012; 57 (8): 2079–2087. DOI: 10.1007/s10620-012-2168-6.
16. Li F., Ma N., Zhao R., Wu G., Zhang Y., Qiao Y., Han D., Xu Y., Xiang Y., Yan B., Jin J., Lv G., Wang L., Xu C., Gao X., Luo S. Overexpression of miR-483-5p/3p cooperate to inhibit mouse liver fibrosis by suppressing the TGF-β stimulated HSCs in transgenic mice. *J. Cell. Mol. Med*. 2014; 18 (6): 966–974. DOI: 10.1111/jcmm.12293.
17. Kumar S., Wang J., Rani R., Gandhi C.R. Hepatic deficiency of augmenter of liver regeneration exacerbates alcohol-induced liver injury and promotes fibrosis in mice. *PLoS One*. 2016; 11 (1): e0147864. DOI: 10.1371/journal.pone.0147864.
18. Jiang S.J., Li W., An W. Adenoviral gene transfer of hepatic stimulator substance confers resistance against hepatic ischemia-reperfusion injury by improving mitochondrial function. *Hum. Gene Ther*. 2013; 24 (4): 443–456. DOI: 10.1089/hum.2012.219.
19. Zhang J., Li Y., Jiang S., Yu H., An W. Enhanced endoplasmic reticulum SERCA activity by overexpression of hepatic stimulator substance gene prevents hepatic cells from ER stressinduced apoptosis. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2014; 306 (3): 279–290. DOI: 10.1152/ajpcell.00117.2013.

Статья поступила в редакцию журнала 27.12.2017.
Received 27 December 2017.