

DOI:10.35401/2500-0268-2020-18-2-51-56

И.Е. Коткас*, В.П. Земляной

ОЦЕНКА УЛУЧШЕНИЯ РЕГЕНЕРАТОРНОЙ СПОСОБНОСТИ ПЕЧЕНОЧНОЙ ТКАНИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ПОСЛЕ ВЫПОЛНЕНИЯ РЕЗЕКЦИИ ПЕЧЕНИ

ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

✉ * И.Е. Коткас, Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, 191015, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д. 41, e-mail: inna.kotkas@yandex.ru

Поступила в редакцию 17 февраля 2020 г. Исправлена 29 апреля 2020 г. Принята к печати 6 мая 2020 г.

Обоснование Необходимость поиска наиболее эффективных способов восстановления функции печени после выполнения ее резекции.

Цель Оценка эффективности использования клеточных технологий при резекции печени в эксперименте.

Материал и методы В эксперимент включено 210 мышей линии C57 black. Все особи разделены на 4 группы, по 60 особей в группах №1–3 и 30 особей в группе №4. Особям групп №1–3 выполнялись резекции печени в объеме 60–65% от всей массы печени. Особям группы №1 стволовые клетки вводились интраоперационно внутривенно, №2 – интраоперационно интрапортально. Особям группы №3 стволовые клетки не вводились. Особи группы №4 (n = 30) были выведены из эксперимента с целью определения средней массы печени и получения стволовых клеток.

Результаты На 10-е сутки после операции масса печени мышей в группе №2 соответствовала нормальным показателям, в группе №1 составляла 79% от нормы, №3 – 62,6% от нормы. Уровень общего белка и альбумина на 10-е сутки после операции в группе №2 был в пределах нормы, в группе №1 составил 75 и 87% нормы соответственно, №3 – 51,7 и 64,5% нормы соответственно. На 10-е сутки после операции уровень АСТ в группе №2 был на 4% выше исходного, №1 – на 26%, №3 – на 58% выше исходного. Уровни АСТ и щелочной фосфатазы на 10-е сутки после операции в группе №1 были соответственно на 51 и 189% выше первоначального, №2 – на 5,9 и 49% и в №3 – на 90 и 266% выше исходного соответственно.

Заключение Использование клеточных технологий при резекции печени способствует более быстрому восстановлению функции печени в послеоперационном периоде.

Ключевые слова: резекция печени, клеточные технологии, стволовые клетки, восстановление функции печени.

Цитировать: Коткас И.Е., Земляной В.П. Оценка улучшения регенераторной способности печеночной ткани при использовании клеточных технологий после выполнения резекции печени. *Инновационная медицина Кубани*. 2020;18(2):51–56. doi:10.35401/2500-0268-2020-18-2-51-56

Inna E. Kotkas*, Viacheslav P. Zemlianoi

ENHANCED LIVER REGENERATION WHEN USING CELL THERAPY AFTER LIVER RESECTION

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia

✉ * Inna E. Kotkas, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, 41, Kirochnaya str., St. Petersburg, 191015, e-mail: inna.kotkas@yandex.ru

Received 17 February 2020. Received in revised form 29 April 2020. Accepted 6 May 2020.

Background The need to find the most effective ways to restore liver function after performing its resection.

Objective To evaluate the effectiveness of the use of stem cell technology in liver resection in an experiment.

Material and methods 210 C57 black mice were included in the experiment. All individuals were divided into 4 groups, 60 individuals in groups 1–3 and 30 individuals in group 4. Individuals of groups 1–3 underwent liver resections in the amount of 60–65% of the total liver mass. To the individuals of group 1, stem cells were administered intraoperatively intravenously, group 2 – intraoperatively intraportally. No stem cells were introduced to individuals of group 3. Individuals of group 4 (n = 30) were removed from the experiment to determine the average liver mass and obtain stem cells.

Results On the 10th day after the operation, the liver mass of mice in group 2 corresponded to normal indicators, in group 1 it was 79% of the norm, in group 3 – 62.6% of the norm. The level of total protein and albumin on day 10 after surgery in group 2 was within normal limits, in group 1 – 75% and 87% of the norm, in group 3 – 51.7% and 64.5% of the norm respectively. On the 10th day after the operation, the AST level in group 2 was 4% higher than the baseline, in group 1 – 26%, in group 3 – 58% higher than the baseline. The level of AST and alkaline phosphatase on day 10 after surgery in group 1 was 51% and 189% higher than the initial level, in group 2 – 5.9% and 49%, in group 3 – 90% and 266% higher respectively.

Conclusion The use of stem cell technology in liver resection contributes to a faster restoration of liver function in the postoperative period.

Keywords: liver resection, cell technology, stem cells, restoration of liver function.

Cite this article as: Kotkas I.E., Zemlianoi V.P. Enhanced liver regeneration when using cell therapy after liver resection. *Innovative Medicine of Kuban*. 2020;18(2):51–56. doi:10.35401/2500-0268-2020-18-2-51-56

ВВЕДЕНИЕ

Улучшение регенерации тканей является важной задачей в современной хирургии. Наиболее ярко выраженной регенераторной способностью в организме человека обладает печень [1]. Однако и ее резерв исчерпаем, что создает хирургам ограничения в резецируемом объеме печени. Достаточно много исследователей как отечественных, так и зарубежных школ уделяют внимание процессам регенерации печени у млекопитающих [2–4]. Чаще всего для изучения регенераторных процессов в печени после резекции используют метод G.M. Higgins и R.M. Anderson (1931) [5].

Процессы регенерации после удаления части органа или ткани происходят за счет нескольких вариантов: размножения, гипертрофии или полиплоидизации клеток [6, 7]. Восстановление печени после резекции главным образом связано с полиплоидизацией и гипертрофией гепатоцитов. Зарубежными исследователями установлено, что при повреждении печени в ее ткань происходит миграция мультипотентных стромальных клеток-предшественников из костного мозга и других органов [8]. До конца не изучено, какова истинная функция мультипотентных стромальных клеток в регенерации печени. Есть мнение, что они могут как дифференцироваться непосредственно в клетки печени, так и выделять биологически активные вещества, участвующие в стимуляции репаративной регенерации печеночной ткани [9].

В связи с имеющимся фактом о миграции мультипотентных стромальных клеток-предшественников в область поврежденной ткани печени целесообразно изучить влияние непосредственного введения стволовых клеток на регенераторные процессы и функцию печени на фоне выполнения резекции.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Экспериментальное исследование выполнялось согласно этическим принципам обращения с животными, в том числе положениям Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986). В исследовании участвовали мыши линии

C57 black в возрасте от 12 до 18 недель. Стволовые клетки получали из аспирата, выделенного из бедренных и большеберцовых костей, после декапитации животных, выполненной под общим обезболиванием. Культивирование проводилось до достижения конfluence. Выполняли три пассажа клеток. С помощью проточной цитометрии подтверждался фенотип клеток.

В эксперименте участвовало 210 особей, которые были разделены на 4 группы. В группы №1, 2 и 3 входило по 60 особей. Всем особям данных групп выполнялась резекция печени в объеме 60–65% от всей ее массы. Особям группы №1 стволовые клетки вводились внутривенно во время оперативного вмешательства. Особям группы №2 клеточные культуры были введены интраоперационно интрапортально. Особям группы №3 стволовые клетки не вводились. Особи группы №4 в количестве 30 были выведены из эксперимента до его начала с целью определения средней массы печени у данной линии мышей и получения стволовых клеток. Особи групп №1, 2 и 3 частично выводились из эксперимента на 5-е и 10-е сутки после оперативного вмешательства. В каждой группе проводилась оценка следующих параметров: масса животного, масса печени, биохимические показатели крови (общий белок, альбумин, АЛТ, АСТ, щелочная фосфатаза, мочевины, креатинин). Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета программ Statistica 10.0 и Microsoft Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Перед началом эксперимента в группах №1, 2 и 3 была определена масса тела особей (табл. 1), а также взяты анализы крови для оценки биохимических показателей (табл. 2).

На основании проведенного статистического анализа данных (табл. 1, 2) достоверных различий в группах перед началом эксперимента по массе тела и биохимическим показателям не выявлено ($p > 0,05$).

На 5-е сутки после резекции печени особям всех групп были определены биохимические показатели крови и масса тела. Также по 30 особей из каждой

Таблица 1
Масса тела (г) особей групп №1, 2 и 3 до начала эксперимента

Table 1
Body weight (gm) of individuals in groups 1, 2 and 3 before the experiment

№ группы	Количество особей	Статистический показатель						
		Значение	Стандартное отклонение	Минимум	Максимум	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль
1	60	25,12	1,65	21,065	30,669	25,317	23,9465	26,0105
2	60	25,14	1,62	21,83	28,681	25,0345	23,9565	26,2075
3	60	24,79	1,43	21,493	28,814	24,791	24,106	25,582

Таблица 2
Средние значения биохимических показателей крови в группах №1, 2 и 3 до начала эксперимента

Table 2
Average values of blood biochemical parameters in groups 1, 2 and 3 before the start of the experiment

Биохимический показатель крови	№ группы		
	1	2	3
Общий белок, г/дл	5,39 ± 1,09	5,40 ± 1,08	5,66 ± 1,05
Альбумин, г/дл	3,17 ± 0,37	3,15 ± 0,41	3,18 ± 0,67
АЛТ, ед/л	45,17 ± 1,75	47,68 ± 1,81	48,16 ± 2,84
АСТ, ед/л	66,73 ± 1,99	67,08 ± 2,24	65,27 ± 2,34
Щелочная фосфатаза, ед/л	55,52 ± 1,69	55,90 ± 1,89	57,47 ± 1,94
Мочевина, ммоль/л	6,65 ± 0,58	6,71 ± 0,65	6,48 ± 0,45
Креатинин, мг/дл	0,56 ± 0,09	0,53 ± 0,11	0,45 ± 0,09

Таблица 3
Средние значения массы тела в группах №1, 2 и 3 до операции и на 5-е и 10-е сутки после оперативного вмешательства

Table 3
Average body weight values in groups 1, 2 and 3 before surgery and on days 5 and 10 after surgery

№ группы	Масса тела, г		
	до операции	на 5-е сутки	на 10-е сутки
1	25,12 ± 1,65	24,41 ± 1,65	24,67 ± 1,42
2	25,14 ± 1,63	24,53 ± 1,62	25,53 ± 1,8
3	24,99 ± 1,43	23,86 ± 1,42	24,56 ± 1,35

группы было выведено из эксперимента для оценки изменения массы печени. На 10-е сутки после резекции печени у оставшихся особей была определена масса тела и взяты биохимические показатели крови, после чего они были выведены из эксперимента с целью определения изменения массы резецированной печени. Изменения массы тела в группах на 5-е и 10-е сутки после операции представлены в таблице 3 и на рисунке 1.

По данным таблицы 3, на 5-е сутки после операции снижение массы тела отмечалось во всех трех группах. При статистическом сравнении показателей выявлено следующее: несмотря на то, что средние показатели массы тела в группе №2 выше, чем

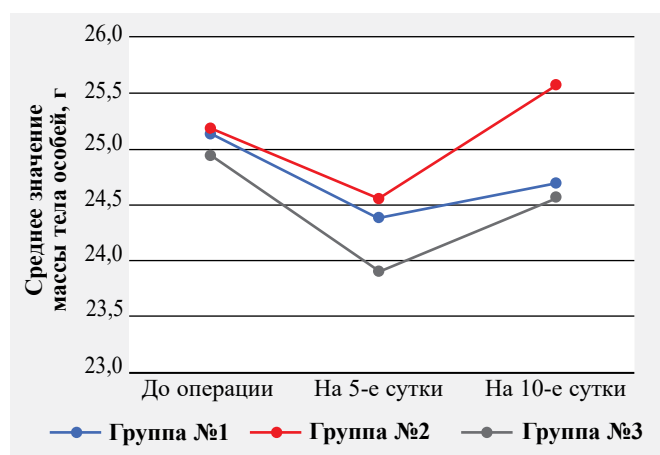


Рисунок 1. Средние значения массы тела особей групп №1, 2 и 3 до оперативного вмешательства и на 5-е, 10-е сутки после операции

Figure 1. Average values of body weight of individuals of groups 1, 2 and 3 before surgery and on days 5 and 10 after surgery

в остальных группах, достоверного различия между массой тела на 5-е сутки после операции в группах №1 и 2 не выявлено ($p = 0,766$). Однако обнаружены достоверные различия между средними значениями массы тела в группах №1 и 3 ($p = 0,026$) и №2 и 3 ($p = 0,005$). Таким образом, в группе №3, в которой интраоперационно не было использовано применение стволовых клеток, отмечается более значимое снижение массы тела по сравнению с группами №1 и 2. При этом между группами, в которых стволовые клетки вводились интраоперационно разными способами, достоверных различий не найдено.

На 10-е сутки после операции отмечалось увеличение массы тела во всех трех группах. Наибольший рост массы тела отмечен в группе №2 (внутрипортальное введение стволовых клеток во время резекции печени). На втором месте находилась группа №1 (внутривенное интраоперационное введение стволовых клеток). Наименьший прирост массы тела отмечен в группе №3 (без введения стволовых клеток). При этом достоверные различия в изменении массы тела выявлены только между группами №2 и 3 ($p = 0,022$).

На 5-е и 10-е сутки после операции у выведенных из эксперимента животных была определена масса печени. Предварительно перед началом эксперимента у 30 особей данной линии была определена средняя масса печени в норме (табл. 4).

Таблица 4
Средняя масса печени (г) у мышей линии C57 black

Table 4
The average weight of the liver (gm) in mice of the line C57 black

Количество особей	Значение	Стандартное отклонение	Минимум	Максимум	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль
30	1,42	0,21	0,982	2,005	1,384	1,303	1,493

Таблица 5
Изменение массы печени в группах №1, 2 и 3 на 5-е и 10-е сутки после оперативного вмешательства

Table 5
Changes in liver mass in groups 1, 2 and 3 on days 5 and 10 after surgery

№ группы	Масса печени, г	
	на 5-е сутки	на 10-е сутки
1	0,51	1,13
2	0,62	1,58
3	0,41	0,89

В таблице 5 и на рисунке 2 представлены показатели изменения массы печени на 5-е и 10-е сутки после операции.

В таблицах 6, 7 и 8 представлены подробные данные по показателям массы печени в группах №1, 2 и 3 соответственно.

Как видно из таблиц 6–8, во всех группах на 5-е сутки после операции отмечается снижение массы печени. Наибольшее ее снижение наблюдается в группе №3 (без интраоперационного введения ство-

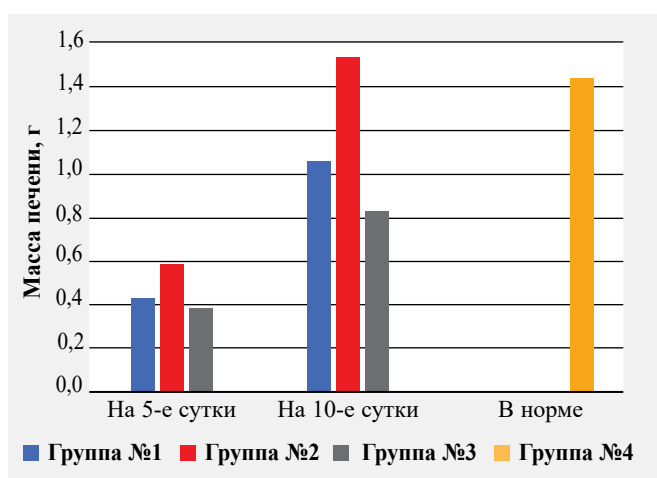


Рисунок 2. Средние значения массы печени на 5-е и 10-е сутки после операции

Figure 2. Average values of liver mass on days 5 and 10 after surgery

ловых клеток), меньше всего масса печени снизилась в группе №2 (внутрипортальное введение стволовых клеток), промежуточное положение занимает группа №1 (с внутривенным введением стволовых клеток) ($p = 0,00001$).

Таблица 6
Показатели массы печени на 5-е и 10-е сутки после операции в группе №1

Table 6
Indicators of liver mass on days 5 and 10 after surgery in group 1

Сутки	Количество особей	Статистический показатель						
		Значение	Стандартное отклонение	Минимум	Максимум	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль
5-е	30	0,51	0,02	0,458	0,544	0,511	0,489	0,526
10-е	30	1,13	0,02	1,097	1,162	1,13	1,116	1,143

Таблица 7
Показатели массы печени на 5-е и 10-е сутки после операции в группе №2

Table 7
Indicators of liver mass on days 5 and 10 after surgery in group 2

Сутки	Количество особей	Статистический показатель						
		Значение	Стандартное отклонение	Минимум	Максимум	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль
5-е	30	0,62	0,01	0,596	0,643	0,6285	0,61	0,633
10-е	30	1,58	0,02	1,517	1,622	1,576	1,565	1,593

Таблица 8
Показатели массы печени на 5-е и 10-е сутки после операции в группе №3

Table 8
Indicators of liver mass on days 5 and 10 after surgery in group 3

Сутки	Количество особей	Статистический показатель						
		Значение	Стандартное отклонение	Минимум	Максимум	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль
5-е	30	0,41	0,02	0,379	0,447	0,4105	0,4	0,42
10-е	30	0,89	0,01	0,876	0,909	0,892	0,887	0,899

Таблица 9
Динамика биохимических показателей крови в группах №1, 2 и 3
Table 9
Dynamics of blood biochemical parameters in groups 1, 2 and 3

Биохимический показатель крови после операции	Сутки	№ группы		
		1	2	3
Общий белок, г/дл	2-е	3,1 ± 0,95	2,91 ± 0,83	2,64 ± 0,78
	5-е	2,73 ± 0,28	3,24 ± 0,24	2,49 ± 0,29
	10-е	4,07 ± 0,92	5,41 ± 0,90	2,92 ± 0,14
Альбумин, г/дл	2-е	2,12 ± 0,44	2,22 ± 0,42	1,99 ± 0,42
	5-е	2,31 ± 0,16	2,57 ± 0,24	1,93 ± 0,10
	10-е	2,77 ± 0,53	3,16 ± 0,13	2,07 ± 0,10
АЛТ, ед/л	2-е	76,4 ± 2,08	77,00 ± 2,12	81,85 ± 1,87
	5-е	71,8 ± 1,61	66,02 ± 1,69	79,02 ± 1,74
	10-е	57,0 ± 1,57	49,21 ± 1,42	76,17 ± 1,98
АСТ, ед/л	2-е	126,35 ± 2,58	123,49 ± 2,83	127,32 ± 2,72
	5-е	120,35 ± 2,04	84,62 ± 2,40	126,16 ± 2,43
	10-е	100,32 ± 3,40	71,30 ± 1,75	124,29 ± 2,43
Щелочная фосфатаза, ед/л	2-е	200,64 ± 2,53	197,69 ± 2,22	212,84 ± 2,68
	5-е	189,59 ± 2,14	174,91 ± 2,17	210,70 ± 2,64
	10-е	159,86 ± 1,61	82,71 ± 2,07	209,88 ± 2,15

В таблице 9 представлены данные о биохимических показателях крови особей трех исследуемых групп на 2, 5 и 10-е сутки после операции.

На основании представленных данных видно, что показатели общего белка и альбумина на 2-е сутки после операции снижаются во всех трех группах исследования. При сравнении показателей общего белка между группами №1 и 3, а также между группами №2 и 3 были выявлены статистически значимые различия ($p = 0,0000$). При сравнении групп №1 и 2 достоверных различий не выявлено ($p = 0,230$). При сравнении групп по показателям альбумина отмечены достоверно значимые различия между группами №2 и 3 ($p = 0,001$). Между группами №1 и 2 ($p = 0,125$) и №1 и 3 ($p = 0,069$) данные различия не выявлены. На 5-е и 10-е сутки после операции во всех группах отмечалось увеличение уровня общего белка и альбумина. Однако в группе №2 показатели практически достигают исходного дооперационного значения. На втором месте по увеличению показателей находится группа №1. Незначительное увеличение показателей общего белка и альбумина отмечается в группе №3. При сравнении всех групп одновременно и попарно выявлены достоверные различия ($p = 0,00001$).

Уровни АЛТ, АСТ и щелочной фосфатазы повышаются во всех трех группах на 2-е сутки после операции. Начиная с 5-х суток во всех группах отмечается снижение уровня данных показателей. Однако максимальное снижение печеночных ферментов зафиксировано в группе №2. В группе №3 снижение показателей проявлено незначительно. Группа №1 занимает промежуточное положение по снижению уровня печеночных ферментов. При сравнении всех

трех групп одновременно и попарно выявлены статистически значимые различия ($p = 0,00001$).

На 10-е сутки после резекции печени в группе №2 показатели печеночных ферментов приближаются к дооперационному уровню. В группе №3 на 10-е сутки после операции показатели печеночных ферментов находились на уровне показателей, зарегистрированных на 5-е сутки после операции. В группе №1 отмечалось снижение уровня трансаминаз и щелочной фосфатазы больше, чем в группе №3, но намного менее выражено, чем в группе №2. Достоверность различий подтверждена статистически ($p = 0,00001$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенного экспериментального исследования можно отметить, что интраоперационное введение стволовых клеток при выполнении резекции печени способствует как увеличению объема печени в послеоперационном периоде, так и улучшению функции печеночной ткани, что проявляется в виде повышения уровня общего белка и альбумина и снижения уровня печеночных ферментов.

Также при сравнении внутрипортального и внутривенного способа введения стволовых клеток с целью улучшения репаративной регенерации печеночной ткани наиболее эффективным оказался способ введения, обеспечивающий непосредственную доставку стволовых клеток в орган.

Таким образом, интраоперационное использование стволовых клеток при резекции печени с непосредственной их доставкой к органу является эффективным способом влияния на репаративную регенерацию печеночной ткани и восстановление функции печени в послеоперационном периоде.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Michalopoulos GK. Liver regeneration. *J Cell Physiol.* 2007;213:286–300. PMID: 17559071. PMCID: PMC2701258. doi:10.1002/jcp.21172
2. Сидорова В.Ф., Рябинина З.А., Лейкина Е.М. Регенерация печени у млекопитающих. Л.: Медицина; 1966. 205 с. [Sidorova VF, Ryabinina ZA, Leykina EM. *Liver Regeneration in Mammals*. Leningrad: Meditsina; 1966. 205 p. (In Russ.)]
3. Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science.* 1997;276(5309):60–6. PMID: 9082986. doi:10.1126/science.276.5309.60
4. Michalopoulos GK. Liver regeneration after partial hepatectomy, critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol.* 2010;176:2–13. PMID: 20019184. PMCID: PMC2797862. doi:10.2353/ajpath.2010.090675
5. Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver: restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol.* 1931;72:186–202.
6. Бродский В.Я., Урываева И.В. Клеточная полиплоидия. Пролиферация и дифференцировка. М.: Наука; 1981. 259 с. [Brodsky VYa, Uryvaeva IV. *Polyploidy. Proliferation and Differentiation*. Moscow: Nauka; 1981. 259 p. (In Russ.)]
7. Stanger BZ. Organ size determination and the limits of regulation. *Cell Cycle.* 2008;7:318–24. PMID: 18235243. doi:10.4161/cc.7.3.5348
8. Chen F-M, Wu L-A, Zhang M, Zhang R, Sun H-H. Homing of endogenous stem/progenitor cells for *in situ* tissue regeneration: promises, strategies, and translational perspectives. *Biomaterials.* 2011;32:3189–209. PMID: 21300401. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.12.032
9. Wu X-B, Ran T. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2012;11:360–374. doi:10.1016/S1499-3872(12)60193-3

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Коткас Инна Евгеньевна, к. м. н., заведующая хирургическим отделением, доцент кафедры факультетской хирургии им. И.И. Грекова, Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (Санкт-Петербург, Россия). ORCID ID: 0000-0003-4605-9887. E-mail: inna.kotkas@yandex.ru

Земляной Вячеслав Петрович, д. м. н., профессор, декан хирургического факультета, заведующий кафедрой факультетской хирургии им. И.И. Грекова, Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (Санкт-Петербург, Россия). ORCID ID: 0000-0003-2329-0023

Финансирование

Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

AUTHOR CREDENTIALS

Kotkas Inna E., Cand. of Sci. (Med.), Head of the Surgical Department, Associate Professor, Department of Faculty Surgery named after I.I. Grekov, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov (St. Petersburg, Russia). ORCID ID: 0000-0003-4605-9887. E-mail: inna.kotkas@yandex.ru

Zemlianoi Viacheslav P., Dr. of Sci. (Med.), Professor, Dean of the Surgical Faculty, Head of the Department of Faculty Surgery named after I.I. Grekov, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov (St. Petersburg, Russia). ORCID ID: 0000-0003-2329-0023

Funding: the study did not have sponsorship.

Conflict of interest: none declared.