

Патогенетические механизмы изменения активности воспаления и фиброгенеза у больных с хроническим диффузным заболеванием печени после сочетанного применения перфторуглеродной эмульсии и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток

Далгатов Г.Д.¹, Сабурин И.Н.^{1,2}, Зурина И.М.¹, Орлов А.А.¹, Колокольцова Т.Д.¹, Деев Р.В.³

¹ — ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Российской академии медицинских наук, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

² — ГБОУ ДПО Российская медицинская академия последипломного образования, 123995, Москва, ул. Баррикадная, 2/1

³ — Институт стволовых клеток человека, Москва, ул. Губкина, 3

Представлены результаты ограниченного клинического исследования комплексного метода лечения хронических диффузных заболеваний печени (ХДЗП), заключающегося в последовательном введении в печеночный кровоток перфторуглеродной эмульсии (ПЭ) и аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга (ММСК). Продемонстрирована безопасность и клиническая эффективность данного подхода, позволяющего снизить активность воспаления в печени, улучшить ее морфологическую структуру и остановить или замедлить прогрессирование фиброза. Полученные результаты *in vitro* на 3D культуре клеток печени подтвердили патогенетический механизм репарации при ХДЗП.

Ключевые слова: хронические диффузные заболевания печени, перфторуглеродная эмульсия, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки

Список сокращений: ХДЗП — хронические диффузные заболевания печени; ПЭ — перфторуглеродная эмульсия; ПА — печеночная артерия; СМФ — система мононуклеарных фагоцитов; КТ — клеточная трансплантация; ФГ — фетальные гепатобласты; ММСК — мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки

Актуальность проблемы

Проблема лечения ХДЗП с исходом в фиброз и цирроз не решена по настоящее время [2; 28]. В последние годы активно изучаются различные варианты клеточных трансплантаций (КТ) для коррекции ХДЗП [3; 16; 22; 45]. Установлено, что трансфузия стволовых гемопоэтических клеток (CD34⁺) и фетальных гепатобластов (ФГ), в том числе в портальную вену и в печеночную артерию (ПА), улучшают функционально-значимые и морфологические показатели при ХДЗП в эксперименте и в клинике [17; 18; 32; 33; 35–37; 46; 48; 49]. Однако при введении как аутогенных, так и аллогенных клеток в сосудистое русло естественным образом происходит активация системы мононуклеарных фагоцитов (СМФ), что вызывает ухудшение хоуминга клеток и их массивную элиминацию [3; 35; 38–43; 47].

Ранее нами был предложен и описан способ применения перфторуглеродной эмульсии (ПЭ) для лечения ХДЗП, основанный на феномене кумуляции ПЭ в фагоцитах в зоне фиброза с замедлением процесса избыточного фиброгенеза [8–13; 23], вызванном, в свою очередь, активацией системы мононуклеарных фагоцитов [20; 21; 30; 31] при введении ПЭ в кровоток. Известно, что сразу после введения ПЭ в кровоток она фагоцитируется различными тканевыми макрофагами, вызывая преходящее снижение реактивности СМФ, проявляющееся замедлением фагоцитоза и иммуносупрессией сроком до 3 сут. [1; 4; 5; 7; 25; 29; 44]. Мы предположили, что феномен фазного влияния ПЭ на реактивность СМФ при последователь-

ной инфузии ПЭ и клеток в зону повреждения позволит введенным клеткам избежать агрессивного воздействия СМФ и остаться жизнеспособными в зоне повреждения за счет региональной иммуносупрессии, вызванной фагоцитозом ПЭ. Учитывая уменьшение воспалительной активности, можно предположить, что в качестве дополнительного эффекта уменьшится развитие фиброза. Таким образом, проверка целесообразности региональной КТ на фоне региональной имплантации ПЭ в СМФ зоны повреждения при лечении ХДЗП является актуальной.

Нами выполнено клиническое испытание этой методики у пациентов с ХДЗП, которым, по общехирургическим показаниям выполнялось селективное снижение портального кровотока путем рентгенэндоваскулярной редукции кровотока в селезеночной артерии (РЭРКА) [6; 14; 19]. На электронно-микроскопическом уровне в условиях *in vitro* на клеточной культуре печени исследована возможность захвата частиц ПЭ клетками печени.

Цель исследования — оценить эффективность комплексного метода лечения ХДЗП, заключающегося в последовательном введении в печеночный кровоток перфторуглеродной эмульсии и аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга.

Материал и методы

Все клинико-морфологические исследования были одобрены и выполнялись с согласия Этического комитета 29 ГКБ г. Москвы после получения добровольного информированного согласия пациентов на проведение ма-

нипуляций. В клиническом исследовании участвовали 28 пациентов (17 мужчин и 11 женщин, от 27 до 68 лет) с ХДЗП, разделенных, с сохранением однородности учитываемых параметров, на основную (1-я; n=12) и контрольную (2-я; n=16) группы. По этиопатогенетическим, клинико-лабораторным, возрастным и социальным характеристикам группы были сходными. Причиной ХДЗП у 11 пациентов послужил вирусный гепатит (В, С и D); у 13 — алкогольный гепатит; у 2 — острый токсический (медикаментозный) гепатит; у 1 — аутоиммунный гепатит. Степень печеночной недостаточности (ПН) по Child-Turcotte-Pugh у 2 пациентов оценена как класс «А», у 19 — «В», у 7 — «С». Показанием для РЭРКСА послужила профилактика (n=7) и остановка (n=17) варикозного пищевода или желудочного кровотечения и коррекция асцита.

Первый этап операции у пациентов обеих групп был однотипным и заключался в последовательной эмболизации селезеночной артерии (СА) и инфузии в СА перфторуглеродной эмульсии («Перфторан»TM [15]). Эмболизация СА выполнялась линейными мегаллическими эмболами до достижения редукиции кровотока 2-3 степени. Затем, с целью купирования постэмболизационного синдрома и замедления фиброза [10], в СА вводили 5-15 мл ПЭ.

Второй этап операции выполнялся только пациентам группы 1. Им в СА и, в части случаев, в ПА, вводили 10×10^6 аутологичных ММСК в 20-30 мл физиологического раствора со скоростью 0,5-1 мл/мин. В работе использовали клоногенные культуры ММСК, получаемые после культивирования согласно разработанному ранее протоколу [22]. Изолированные из костного мозга пациентов первичные культуры клеток культивировали в низкой плотности, получая культуры ММСК, обладающие большим клоногенным и дифференцировочным потенциалом и низкой способностью к агрегации в суспензии.

Всем пациентам перед операцией, через сутки и через 1, 3, 6, 12 и 36 мес. после каждой операции выполняли ультразвуковое обследование печени и селезенки, включая доплерографию портального кровотока, эзофагогастроскопию; в эти же сроки выполнялись стандартные клинические лабораторные исследования. Степень печеночной недостаточности (ПН) оценивали согласно классификации С. Child, J. Turcotte (1964), модифицированной R. Pugh с соавт. [2]. При этом перед началом лечения класс «А» был установлен у 2 пациентов, «В» — у 19, «С»

— у 7. Для оценки выраженности печеночной энцефалопатии (ПЭ) применялся тест связи чисел (Рейтана) [2]. Перед началом лечения ПЭ была выявлена у всех пациентов, при этом стадия 2 выявлена у 18, стадия 3 — у 8, стадия 4 — у 2 пациентов (табл. 1).

С целью динамического мониторинга морфофункционального состояния паренхимы печени до- и через 6, 12 и более месяцев после операции всем больным выполнялась аспирационная биопсия печени; при этом цирротическая трансформация печени установлена у 18 пациентов. У части пациентов 1-й группы биопсия выполнялась через 10-20 мин., либо в ближайшие 2-14 сут. после инфузии ММСК и ПЭ; при этом для обнаружения ММСК и клеток Купфера с ПЭ («перфторофагов») выполняли иммуногистохимическое исследование, у 2 пациентов из группы 1 и 1 — из группы 2 — трансмиссионную электронную микроскопию; морфологические исследования выполнялись по стандартной методике [7].

Пациенты наблюдались в сроки до 3 лет, с кратностью не реже одного раза в 6 мес. По показаниям, основанным на данных доплерометрии, дополненных целиакографией, выполнялись повторные РЭРКСА. Инфузии ПЭ повторяли всем пациентам обеих групп каждые 6 мес., в том числе при каждой РЭРКСА; в группе 1 при этом вводили ММСК по описанной методике. В группе 1 это оперативное лечение выполнено в среднем 5 раз (от 1 до 9), а в группе 2 — в среднем 6 раз (от 1 до 8) каждому из пациентов. Кроме того, выполнялось рутинное консервативное лечение по назначению гастроэнтеролога.

Исследования *in vitro* проводили на 3D культуре (сфероидах) клеток печени. Первичную суспензию клеток получали из пункционных биоптатов печени, полученных сразу после оперативного вмешательства методом коллагеназной ферментации. Культивировали в монослойной культуре в течение 3-4 дней в подобранной ростовой среде до 70-80% конфлюэнтности. Для получения сфероидов использовали метод «висячая капля». Прикрепленные культуры отмывали раствором Версена, обрабатывали 0,25% раствором трипсина, инактивировали действие трипсина добавлением небольшого количества сыворотки. Количество клеток в суспензии подсчитывали при помощи клеточного счетчика Countess (Invitrogen) Полученную суспензию центрифугировали. Осадок ресуспендировали до конечной концентрации 80 000 клеток/мл в полной ростовой среде с добавлением ПЭ в объеме 10 мкл на

Таблица

Показатели	Основная группа (n=12)						
	Перед операцией	Период после операции					
		24 ч	7 сут.	30 сут.	90 сут.	6 мес.	3 года
АлТ, (ед/л)	40,2±4,0	43,7±4,9	38,5±4,8	34,5±5,6	36,9±4,8	36,8±2,8	34,4±3,7
АсТ, (ед/л)	60,3±2,7	63,0±3,0	55,9±3,1	47,7±2,3	49,4±2,8	54,7±2,4	48,5±1,6
О. белок (г/л)	44,3±2,7	44,6±2,5	66,7±2,6	65,0±1,9	57,5±3,8	52,7±3,3	58,7±2,4
Альбумин (г/л)	18,8±1,5	19,6±1,4	27±1,5	25,4±1,2	24,2±1,0	23,8±2,3	25,8±2,7
ПТИ (%)	71,0±1,6	72,5±2,0	71,2±1,6	71,4±1,4	68,6±1,2	69,8±1,6	71,4±1,3
АлТ, (ед/л)	41,2±4,4	43,9±4,0	39,2±4,3	40,9±4,3	36,5±4,3	37,8±4,1	40,1±3,8
АсТ, (ед/л)	54,9±3,0	56,7±3,1	47,7±3,5	49,3±3,8	51,3±4,1	53,6±4,1	44,4±5,7
О. белок (г/л)	40,6±3,5	41,1±2,2	40,4±1,7	38,6±2,5	38,9±1,6	39,6±1,8	37,0±1,7
Альбумин (г/л)	19,3±1,6	19,2±1,6	18,4±1,8	18,4±1,5	17,6±1,3	17,9±1,8	18,1±1,8
ПТИ (%)	71,4±1,8	72,3±1,7	71,3±1,5	70,6±1,6	71,7±1,3	73,3±1,9	70,1±3,1

1 мл питательной среды. Для получения «висячих капель» из полученной суспензии на крышку 90-мм чашки Петри (Corning) наносили капли объемом 20-30 мкл, для предотвращения испарения в чашку добавляли 5-6 мл полной ростовой среды. Клетки культивировали в «висячих каплях» в стандартных условиях (37°C, 5% CO₂).

Для исследования ультраструктуры через 10 суток полученные сфероиды фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида на 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,2-7,4), дофиксировали 1% раствором тетраоксида осмия. После этого осуществляли обезвоживание и обезжиривание по стандартной схеме. Зафиксированные сфероиды заливали в аралдит. Полутонкие срезы изготавливали на ультратоме «Leica EM UC6» серийно (толщина среза 1 мкм), до максимального диаметра клеточного сфероида, окрашивали в течение 30-40 мин нагретой до 60°C смесью (1:1:1:1) 0,25% водного раствора крезолового фиолетового, 0,5% водного раствора толуидинового синего, 1% водного раствора метиленового синего и 1% раствора метилового зеленого. Изучали и фоторегистрировали в видимом световом диапазоне под микроскопом Axiovert 25 (Carl Zeiss, Германия) с помощью цифровой камеры AxioCam HRC (Carl Zeiss, Германия). Ультратонкие срезы монтировали на сетки, контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и изучали в трансмиссионном электронном микроскопе JEM-100B (Япония).

Результаты и обсуждение

Осложнений при проведении РЭРКСА не зарегистрировано, постэмболизационный эффект был практически купирован. Положительный эффект от введения ММСК заключался в следующем. В группе 1 из 12 пациентов 10 в сроки 3-12 ч после операции отмечали появление ощущения «бодрости», «повышения жизненного тонуса», «выносливости и снижения утомляемости»; при этом при тестовом исследовании регистрировалось большее снижение энцефалопатии в сравнении с группой контроля. Эти положительные симптомы примерно в 30% случаев прогрессировали на протяжении 1-2 недель, после чего стабилизировались. В контрольной группе столь выраженный витализирующий эффект нами не регистрировался. Описанная дифференциация между группами сохранялась на протяжении 1-3 мес. Отрицательных и побочных эффектов от введения ММСК в ближайшем и отдаленном послеоперационных периодах не зарегистрировано.

При повторных инфузиях ММСК положительные субъективные ощущения пациенты 1 группы отмечали каждый раз, независимо от того, выполнялась при этом РЭРКСА или нет. Тестовые исследования также регистрировали при этом снижение степени энцефалопатии в опытной группе в сравнении с контролем в течение 1-5 недель. Ранее нами было установлено, что собственно введение ПЭ столь выраженным клиническим эффектом не обладает, и его положительный эффект ограничивается замедлением фиброза и купированием постэмболизационного синдрома; также нами было установлено, что введение ММСК при РЭРКСА без предварительной инфузии ПЭ в СА не демонстрирует столь выраженного эффекта, очевидно, из-за того, что постэмболизационный синдром полностью маскирует положительный эффект от ММСК [10].

Допплерографические показания к проведению повторной РЭРКСА пациентам 1 группы в среднем были установлены на 2-3 мес. позже, чем у пациентов 2 группы.

Лабораторные показатели белоксинтезирующей функции печени у пациентов 1 группы в сроки от 7 до 30 сут. после каждой процедуры значительно увеличивались, стабилизируясь около уровня нормы в сроки от 3 до 6 мес., после чего, как правило, снижались до исходных показателей. В контроле роста этих показателей не отмечено (табл. 1).

При наблюдении в сроки до 3 лет общее различие в группах заключалось в большей нормализации и (или) стабилизации клинических, лабораторных, доплерографических, гистологических и ментальных показателей у пациентов группы 1.

В биоптатах печени в обеих группах в период от 10-20 мин. до 60 сут. после операции обнаруживались активированные клетки Купфера, содержащие включения ПЭ — «перфторофаги».

На электроннограммах клетки СМФ регистрировались в просвете синусоидов, имели ядра с признаками выраженной метаболической активности, их цитоплазма была заполнена каплями ПЭ, имеющими мелкогранулярное строение, средней электронной плотности.

Известно, что в 3D культурах клетки сохраняют характерное для тканей и органов строение в отличие от монослойных 2D культур и способны морфологически и функционально соответствовать тканям *in situ*, поэтому влияние перфторана *in vitro* было исследовано на сфероидах [24]. Сфероиды клеток печени формировались к 5-7 дню культивирования и состояли из нескольких типов клеток: гепатоцитов, в том числе и многоядерных, моноцитов, овальных клеток и др. Исследование полутонких срезов сфероидов показало, что добавление в ростовую среду ПЭ приводило к появлению в сфероидах из печени клеток с большим количеством вакуолей (рис. 1).

Анализ ультратонких срезов сфероидов выявил ультраструктурные изменения в клетках. Помимо крупных вакуолей в цитоплазме были обнаружены мультивезикулярные образования размером 0,5-1,5 мкм (рис. 2). Формирование таких же структур наблюдали другие исследователи в астроглиальных клетках и нейронах органотипической культуры гиппокампа крысы после добавления перфторана. Эти вторичные лизосомы, содержащие частицы эмульсии, были назвали «перфторосомами» [26]. По

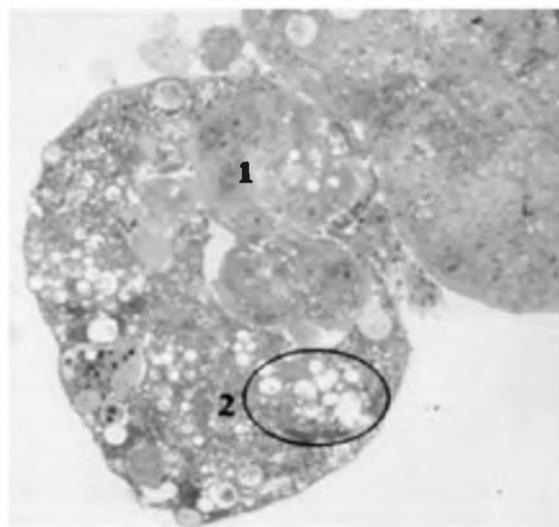


Рис. 1. Структура 3D сфероида из клеток печени: 1 — многоядерная клетка; 2 — вакуолизация клеток сфероида

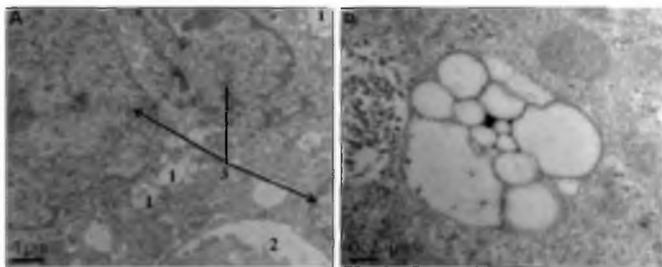


Рис. 2.
 А — Ультраструктура клетки сфероида:
 1 — мультивезикулярные структуры — перфторосомы; 2 — митохондрия; 3 — ядра;
 Б — перфторосома

их мнению, наличие «перфторосом» в клетках свидетельствует об их высокой эндосомальной активности.

Обращало на себя внимание, что часть клеток имели признаки повреждения: неравномерно расширенные перинуклеарные пространства, нарушение целостности плазмолеммы, в единичных клетках — гиперплазия аппарата Гольджи и разрушение митохондрий. Такие клетки содержали относительно большее число мультивезикулярных частиц, что вероятно, могло быть связано с их высокой макрофагальной активностью, что подтверждает возможность влияния ПЭ на реактивность СМФ

При гистологическом исследовании биоптатов печени, полученных от больных основной группы, в течение от 15-20 мин. до 24 ч после операции в просветах синусоидов и на их периферии помимо капель ПЭ и активированных макрофагов обнаруживались ММСК, расположенные как дискретно, так и в виде небольших кластеров; часть их была повреждена. На электроннограммах ММСК отличались от клеток Купфера отсутствием включений ПЭ. В более поздние сроки ММСК в биоптатах не выявлялись. При анализе морфологических данных исследования печени в динамике в сроки до 3 лет в обеих группах выявлены признаки стабилизации процесса хронического воспаления и коллагеногенеза; достоверного различия данных между группами не выявлено.

При динамическом наблюдении на протяжении 3 лет из-за полиорганной недостаточности умер через 2 мес. после операции один пациент из группы 1 («С» по Child-Pugh). В контрольной группе на протяжении года умерло 3 пациентов («С» по Child-Pugh). За период наблюдения по социальным и организационным причинам прекратили лечение 7 пациентов из основной группы и 9 пациентов из группы контроля, остальные продолжают находиться под наблюдением.

Выводы

Впервые в клинических условиях разработан и применен комплексный способ лечения ХДЗП, основанный на введении в портальный тракт мультиспособных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга с предварительной редукцией портального кровотока и регионального введения ПЭ с целенаправленным формированием перфторофагов в поврежденном органе. Продемонстрирована безопасность и клиническая эффективность данного подхода. Сочетанное применение трех различных патогенетических способов воздействия на процесс развития ХДЗП имеет синергический эффект, позволяющий снизить активность воспаления в печени, улучшить ее морфологическую структуру и остановить или замедлить прогрессирование фиброза.

Список литературы

1. Белоярцев Ф.Ф. Перфторированные углероды в биологии и медицине. Пушкино 1980: 5-21.
2. Болезни печени и желчевыводящих путей: Руководство для врачей / Под редакцией В.Т. Ивашкина. М.: ООО «Издат. Дом «М-Вести» 2005.
3. Брюховецкий А.С. Трансплантация нервных клеток и тканевая инженерия мозга при нервных болезнях. М.: ЗАО «Клиника восстановительной интервенционной неврологии и терапии «Нейровита» 2003.
4. Голубев А.М., Белоярцев Ф.Ф., Васильев А.З. и др. Реакции биологических систем при замещении крови эмульсиями фторуглеродов. Москва, 1993.
5. Голубев А.М., Леонтьева Г.Л., Коркмасова М.Л. и др. Морфофункциональные особенности и фагоцитарная активность системы фагоцитарных клеток перитонеального экссудата крыс после внутрибрюшинного введения перфторана. Физиологическая активность фторсодержащих соединений [эксперимент и клиника]. Пушкино: ОНТИ ПНЦ РАН 1995.
6. Гранов А.М., Борисов А.Е. Зндваскулярная хирургия печени. П.: Медицина 1986.
7. Гусейнов А.-К.Г., Мороз В.В., Голубев А.М., Гусейнов А.Г. Применение перфторана в лечении распространенного гнойного перитонита. // Физиологически активные вещества на основе перфторуглеродов в экспериментальной и классической медицине. Физиологически активные вещества на основе перфторуглеродов в экспериментальной и клинической медицине. Всеармейская научная конференция 22-24.10.1999. СПб.: ВМедА, 1999: 19.
8. Далгатов Г.Д., Меджидов Р.Т., Алкадарский А.С. и др. Применение перфторуглеродных эмульсий для лечения постнекротического цирроза печени в эксперименте (предварительные результаты). Физиологически активные вещества на основе перфторуглеродов в экспериментальной и клинической медицине. Всеармейская научная конференция 22-24.10.1999. СПб.: ВМедА, 1999: 20-1.
9. Далгатов Г.Д., Меджидов Р.Т., Алкадарский А.С. Перфторофагальный гранулематоз против фиброза? Физиологически активные вещества на основе перфторуглеродов в экспериментальной и клинической медицине. Всеармейская научная конференция 22-24.10.1999. СПб.: ВМедА, 1999: 23-8.
10. Далгатов Г.Д., Зубрицкий В.Ф., Бакулин И.Г. и др. Клиническая апробация феномена фагоцитоза перфторуглеродной эмульсии в лечении цирроза печени. Росс. журнал гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. Приложение №28. Мат.-лы 12 Российской Гастроэнтерологической недели 16-18 октября 2006 Москва; 2006; 16(5): 76.
11. Далгатов Г.Д., Меджидов Р.Т., Мадиева М.Н., Шахназарова М.Д. Применение перфторуглеродных соединений для профилактики соединительнотканых сращений. Патент РФ на изобретение №2161959, 01.10.96.
12. Далгатов Г.Д., Меджидов Р.Т. Средство для лечения и профилактики патологического разрастания соединительной ткани в паренхиматозных органах. Патент РФ на изобретение №2146133, 06.07.96.
13. Журавлев В.А., Распутин П.Г., Золатарев А.Г., Косых А.А. Ультраструктура гепатоцитов патологически измененной печени после частичной гепатэктомии с использованием перфторана. Физиологически активные вещества на основе перфторуглеродов в экспериментальной и клинической медицине. Всеармейская научная конференция 89.10.1997. СПб.: ВМедА, 1997: 43-4.
14. Зубарев П.Н. Развитие идеи хирургического лечения больных портальной гипертензией в Военно-Медицинской Академии Актовая речь в день 202-й годовщины Академии. СПб.: ВМедА 2000: 24.
15. Инструкция по применению перфторана. Министерство Здравоохранения и медицинской промышленности РФ: лицензия №64/396/97 от 21.04.97 г. Приказ МЗ РФ №50 от 13.02.96 г. -Регистрационный №96/50/10. Утверждено Фармакологическим Государственным Комитетом 24 июня 1999 г.
16. Исаев А.А., Мелихова В.С. Применение клеток пуповинной крови в клинической практике. Клет. транспл. тканевая инженер. 2008; 3(1): 34-41.
17. Киясов А.П., Одинцова А.Х., Гумерова А.А. и др. Трансплантация аутогенных гемопоэтических стволовых клеток больным хроническими гепатитами. Клет. транспл. тканевая инженер. 2008; 3(1): 70-5.

18. Котив Б.Н. Эмболизация селезеночной артерии у больных с гипертензивом на фоне портальной гипертензии. *Ангиология и сосудистая хирургия* 2002; №3 Прилож.: С6.
19. Люндуп А.В. Применение мезенхимальных стромальных клеток костного мозга для коррекции фиброзирующего повреждения печени (экспериментальное исследование). Автореф. дисс. канд. мед. наук. Москва. — 2012. — 26 с.
20. Маянский А.Н., Маянский Д.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. Новосибирск: Наука 1983.
21. Маянский Д.Н., Виссе З., Декер К. Новые рубежи гепатологии. Новосибирск: Изд-во РАМН, Сибирское отделение 1992.
22. Пулин А.А. Выбор оптимальных методов культивирования и трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток Автореф. дисс. на соискание ученой степени д-ра мед. наук. Москва 2008.
23. Распутин П.Г. Применение эмульсий перфторорганических соединений в резекционной хирургии печени [экспериментально-клиническое исследование]. Автореф. дисс. на соискание ученой степени д-ра мед. наук. Киров 2000: 18.
24. Сабурова И.Н., Горкун А.А., Кошелева Н.В. и др. Сопоставление поведения стромальных клеток пупочного канатика и мультипотентных стромальных клеток костного мозга в 2D и 3D культуре: моделирование стромальной регенерации. *Вестник новых медицинских технологий*. -2009. -№4. -С.9-11.
25. Хохлова М.П., Логинова Л.Н., Гласко Е.Н. Морфологическая оценка реакции систем мононуклеарных фагоцитов при введении различных перфторорганических соединений в эксперименте. Медико-биологические аспекты применения эмульсий перфторуглеродов. Пушино: ОНТИ НЦБИ АН СССР 1983: 151-7.
26. Цыганова В.Г., Попов В.И., Рогачевский В.В. и др. Исследование влияния перфторуглеродной эмульсии на клетки центральной нервной системы крыс *in vivo* и *in vitro*. Доклады АН.- 200., 375(1), 125-129
27. Чирский В.С. Биопсийная диагностика неопухолевых поражений печени. СПб.: МАЛО 2009.
28. Шерлок Ш., Дули Дж. Заболевания печени и желчных путей. М.: Геотар Медицина 1999.
29. Шехтман Д.Г., Сафронова В.Г., Склифас Л.Я. и др. Модифицирующее действие эмульсий ПФОС и других корпускулярных сред на активность нейтрофилов. Перфторорганические соединения в биологии и медицине. Пушино: ОНТИ ПНЦ РАН 1997.
30. Albanis E., Friedman S.L. Hepatic fibrosis. Pathogenesis and principles of therapy. *Clin. Liver Dis.* 2001.- 5: 315-334, v-vi.
31. Bachem M.G., Meyer D., Melchior R. et al. Activation of rat liver perisinusoidal lipocytes by transforming growth factors derived from myofibroblastlike cells. A potential mechanism of self perpetuation in liver fibrogenesis. *J. Clin. Invest.* 1992; 89(1): 19-27.
32. Bataller R., Brenner, D.A. Hepatic stellate cells as a target for the treatment of liver fibrosis. *Semin. Liver Dis.* 2001; 21: 437-51.
33. Carvalho A.B., Quintanilha L.F., Dias J.V. et al. Bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells do not reduce fibrosis or improve function in a rat model of severe chronic liver injury. *Stem Cells* 2008; 26(5): 1307-14.
34. Di Nicola M., Carlo-Stella C, Magni M. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002; 99: 3838-43.
35. Gressner A.M. The cell biology of liver fibrogenesis — an imbalance of proliferation, growth arrest and apoptosis of myofibroblasts. *Cell and Tissue Res.* 1998; 292(3): 447-52.
36. Gressner A.M., Hoffmann C, Bachem M.G. et al. The contribution of hepatocytes to cytokine-directed activation of fat-storing cells — a pathogenetic key mechanism in liver fibrogenesis. In: *Cytokines and the Liver. Proceedings of the 78th Falk Symposium* 1995. Netherlands; 58-80.
37. Geerts A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin. Liver Dis.* 2001; 21: 311-35.
38. Gagandeep S, Rajvanshi P, Sokhi RP. et al. Transplanted hepatocytes engraft, survive, and proliferate in the liver of rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *J Pathol.* 2000 May;191(1):78-85).
39. Fang B., Shi M., Liao L. et al. Systemic infusion of FLK1C + J mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Transpl. 2DD4*; 78(1): 83-8.
40. Fang B, Shi M, Liao L, Yang S, Liu Y, Zhao RC. Systemic infusion of FLK1(+) mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Transplantation.* 2004 Jul 15;78(1):83-8
41. Fang B., Song Y., Lin Q. et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells as salvage therapy for treatment of severe refractory acute graft-vs.-host disease in two children. *Ped. Transpl.* 2007; 11: 814-17.
42. Hagihara M., Shimura T., Takebe K. et al. Effects of iso and xeno fetal liver fragments transplantation on acute and chronic liver failure in rats. *Cell Transpl.* 1994; 3(4): 283-90.
43. Kanai N., Hagihara M., Nagamachi Y., Tsuji K. Beneficial effects of immunoisolated fetal and neonatal pig liver fragments on acute liver failure in a large animal. *Cell Transpl.* 1999; 8 (4): 413-7.
44. Leskova G.F., Michunskaya A.B., Kobozeva L.P., Klimenko E.D. Influence of Perforan on Structural and Metabolic Disturbances in the Liver during Exp. Atherosclerosis. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2003; 136C(4).
45. Levinar N., Pai M., Habib N.A. et al. Long-term clinical results of autologous infusion of mobilized adult bone marrow derived CD34⁺ cells in patients with chronic liver disease. *Cell Prolif.* 2008; 41 (Suppl. 1): 115-25.
46. Sakaida I., Terai S., Nishina H., Okita K. Development of cell therapy using autologous bone marrow cells for liver cirrhosis. *Med. Mol. Morphol.* 2005; 38(4): 197-202.
47. Tse W.T., Pendleton J.D., Beyer W.M. et al. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transpl.* 2003; 75(3): 389-97.
48. Yannaki E., Athanasiou E., Xagorari A. et al. G-CSF-primed hematopoietic stem cells or G-CSF per se accelerate recovery and improve survival after liver injury, predominantly by promoting endogenous repair programs. *Exp. Hematol.* 2005; 33(1): 108-9.
49. Zheng J.F., Liang L.J. Intra-portal transplantation of bone marrow stromal cells ameliorates liver fibrosis in mice. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2008; 7(3): 264-70.

Pathogenetic mechanisms of changes in activity of inflammation and fibrogenesis in patients with chronic diffuse liver disease after combined use perfluorocarbon emulsions and multipotent mesenchymal stromal cells

Dalgatov G.D.¹, Saburina I.N.^{1,2}, Zurina I.M.¹, Orlov A.A.¹, Kolokoltsova T.D.¹, Deev R.V.³

¹ — FSBI «Scientific Research Institute of General Pathology and Pathophysiology», Russian Academy of Medical Sciences, 125315, Moscow, Baltiyskaya str, 8

² — GBOU DPO Russian Medical Academy of Postgraduate Education, 123995, Moscow, Barrikadnaja str, 2/1

³ — Institute of Human Stem Cells, Gubkina str, 3

The paper presents the results of the limited clinical study of chronic diffuse liver diseases (CDLD) treatment, that includes consecutive administration of perfluorocarbon emulsion and autologous bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells (MMSC) in to the liver blood flow. The results demonstrated the safety and clinical efficacy of this approach, which allows to reduce the activity of inflammation in the liver and improve its morphological structure and stop or slow the progression of fibrosis. The results obtained in 3D cell culture in vitro confirmed the pathogenetic mechanism of liver repair in patients with CDLD.

Key words: chronic diffuse liver diseases, multipotent mesenchymal stromal cells, perfluorocarbon, liver inflammation