

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МОРФОЛОГИИ
ЧЕЛОВЕКА»

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени
академика В.И. Кулакова»

На правах рукописи

ЕЛЬЧАНИНОВ
Андрей Владимирович

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ
РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ ПОСЛЕ СУБТОТАЛЬНОЙ РЕЗЕКЦИИ В
ЭКСПЕРИМЕНТЕ

03.03.04. – клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация на соискание ученой степени доктора
медицинских наук

Научный консультант:
Доктор медицинских
наук
Т.Х. Фатхудинов

Москва – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1 РЕГЕНЕРАЦИЯ ПЕЧЕНИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ПОСЛЕ ЧАСТИЧНОЙ ГЕПАТЭКТОМИИ.....	14
1.2 ВЛИЯНИЕ ОБЪЕМА РЕЗЕКЦИИ ПЕЧЕНИ НА ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЙ ПРОЦЕСС	25
1.3 РОЛЬ МАКРОФАГОВ В РЕГЕНЕРАЦИИ	31
1.4 ФАКУЛЬТАТИВНЫЕ ПУТИ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ	35
1.5 РЕГЕНЕРАТИВНАЯ МЕДИЦИНА ЗАБОЛЕВАНИЙ ПЕЧЕНИ	40
1.5.1 Острая печеночная недостаточность	42
1.5.2 Хроническая печеночная недостаточность	45
1.5.3. Опухоли печени	49
1.5.4 Метаболические нарушения печени.....	51
1.5.5 Искусственная печень	53
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	60
2.1 Экспериментальная модель	60
2.2 Трансплантация МСК.....	61
2.3 Оценка функции печени.....	61
2.4 Гистологическое исследование	61
2.5 Митотическая активность	62
2.6 Иммуногистохимическое исследование.....	62

2.6 Вестерн-блот анализ	64
2.7 ИФА-анализ	64
2.8 Оценка клеточной гибели	65
2.9 Полимеразная цепная реакция в реальном времени	65
2.10 Получение клеточных культур и культивирование МСК пупочного канатика крыс	72
2.11 Подготовка к иммунофенотипированию	72
2.12 Оценка дифференцировочного потенциала	73
2.13 Оценка функционального состояния митохондрий	74
2.14 Статистический анализ.....	76
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	77
3.1 ДИНАМИКА РЕПАРАТИВНОГО ПРОЦЕССА В ПЕЧЕНИ ПОСЛЕ СУБТОТАЛЬНОЙ РЕЗЕКЦИИ У КРЫС	77
3.1.1 Гистологические изменения регенерирующей печени крыс после субтотальной резекции.....	77
3.1.2 Выживаемость животных	79
3.1.3 Восстановление массы и функции печени.....	80
3.2 ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕПАТОЦИТОВ ПЕЧЕНИ КРЫС ПОСЛЕ СУБТОТАЛЬНОЙ РЕЗЕКЦИИ	83
3.3 РОЛЬ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ В РЕГЕНЕРАЦИЮ ПЕЧЕНИ КРЫС ПОСЛЕ СУБТОТАЛЬНОЙ РЕЗЕКЦИИ	89
3.4.ДИНАМИКА ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ РЕГУЛЯТОРНЫХ МОЛЕКУЛ В ПЕЧЕНИ ПОСЛЕ СУБТОТАЛЬНОЙ РЕЗЕКЦИИ	94
3.5 ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ-РЕГУЛЯТОРОВ РЕПАРАТИВНОГО ПРОЦЕССА ПЕЧЕНИ ПОСЛЕ СУБТОТАЛЬНОЙ РЕЗЕКЦИИ В ЛЕГКИХ И ПОЧКАХ.....	105

3.6 ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ ПОСЛЕ СУБТОТАЛЬНОЙ РЕЗЕКЦИИ	108
3.7 ХАРАКТЕРИСТИКА СИСТЕМЫ МАКРОФАГОВ ПЕЧЕНИ КРЫС ПОСЛЕ СУБТОТАЛЬНОЙ РЕЗЕКЦИИ	121
3.8 СТИМУЛЯЦИЯ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ КРЫС ПОСЛЕ СУБТОТАЛЬНОЙ РЕЗЕКЦИИ С ПОМОЩЬЮ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТРОМАЛНЫХ КЛЕТОК (МСК) ПУПОЧНОГО КАНАТИКА	128
3.8.1. Характеристика иммунофенотипа и функциональных свойств МСК пупочного канатика лабораторных животных	128
3.8.2 Влияние трансплантации МСК пупочного канатика на выживаемость крыс и пролиферативную активность гепатоцитов после субтотальной резекции печени	134
3.8.3 Изучение миграции, дифференцировки и элиминации трансплантированных МСК пупочного канатика при регенерации печени крыс после субтотальной резекции	138
3.8.4 Влияние трансплантации МСК пупочного канатика на соотношение типов макрофагов в регенерирующей печени крыс после субтотальной резекции	149
3.8.5 Влияние трансплантации МСК пупочного канатика на экспрессию генов регуляторных молекул в регенерирующей печени крыс после субтотальной резекции	151
3.8.7 Влияние трансплантации МСК пупочного канатика на функцию митохондрий клеток печени крыс после субтотальной резекции	155
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	164
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	197
ВЫВОДЫ	200
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	202
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	203

ВВЕДЕНИЕ

Регенерация тканей и органов является фундаментальным свойством живых организмов. Наиболее выраженной способностью к регенерации у млекопитающих обладает печень [Сидорова В.Ф. и др., 1966, Michalopoulos G.K., 2007]. После резекции 60-70% печени по поводу опухоли или метастазов у больных развивается так называемый синдром малого остатка органа, при котором объем паренхимы печени, сохранившийся после операции, не способен обеспечивать гомеостаз [Dahm F. et al., 2005]. Синдром малого остатка печени наблюдается у 13-25% пациентов, перенесших резекцию, в то время как показатель смертности в раннем послеоперационном периоде составляет 7% [Hammond J.S. et al., 2011, Kotel'nikova L.P., Budianskaia I.M., 2012], что указывает на возможность стимуляции регенерации печени.

Молекулярные и клеточные механизмы нарушения регенерации печени при синдроме малого остатка остаются малоизученными. Одним из возможных механизмов может быть блок пролиферации гепатоцитов в раннем послеоперационном периоде, что было установлено на модели регенерации печени после субтотальной резекции – удаления 80% и более массы печени крыс [Романова Л.К., 1984]. Причины митотического блока гепатоцитов после субтотальной резекции недостаточно ясны. Одни авторы это связывают с поздним началом экспрессии генов, регулирующих пролиферацию гепатоцитов, например гена *hgf* (фактора роста гепатоцитов) и *tgfb* (трансформирующего фактора роста β) [Sowa J.P. et al., 2008], в других работах эти данные не находят подтверждения [Panis Y. et al., 1998, Masson S. et al., 1999]. Возможными причинами нарушения репаративных процессов при синдроме малого остатка печени являются повреждение эндотелия в результате развивающейся портальной гипертензии [Golriz M. et al., 2015, Gruttadauria S. et al., 2015], а также апоптотическая гибель большого числа

гепатоцитов из-за повышенного уровня провоспалительного цитокина TNF α [Eshkenazy R. et al., 2014].

Несмотря на большой объем резекции печени и нарушение ее регенераторных свойств, существуют резервные возможности органа к восстановлению, которые мало изучены. Общепринятой является точка зрения, в соответствии с которой цитокины IL1b, IL6, IL10 и факторы роста HGF, TGFb, VEGF и др., регулирующие регенерацию печени, секретируются ее клетками. Однако на регенерацию печени могут оказывать влияние другие органы. Например, легкие и почки, в которых повышается экспрессия гена *hgf* в ответ на повреждение печени [Yanagita K. et al., 1992, Kono S. et al., 1992], а также селезенка, макрофаги которой секретируют IL-6 [Asanoma M. et al., 2014]. Важное значение это имеет в условиях критического повреждения печени. Данные о роли легких и почек в регенерации печени после субтотальной резекции печени в литературе отсутствуют.

При блоке пролиферации гепатоцитов в печени увеличивается экспрессия генов NOTCH- и TWEAK/Fn14-сигнальных путей, что приводит к активации прогениторных клеток печени и их дифференцировке в гепатоциты [Furuyama K. et al., 2011, Yanger K. et al., 2013]. Активацию прогениторных клеток может вызывать также удаление около 90% гепатоцитов [He J. et al., 2014]. Участие прогениторных клеток в регенерации печени млекопитающих после резекции 80% массы печени не изучено.

Ключевой клеточной популяцией, регулирующей регенераторные процессы в печени, являются макрофаги. В печени присутствует две популяции макрофагов: бóльшая представлена потомками гемопоэтических клеток желточного мешка, а меньшая имеет костномозговое происхождение [Erelman S. et al., 2014]. По спектру секретируемых факторов различают M1 - провоспалительные макрофаги и M2 - прорегенераторные [Wermuth P.J., Jimenez S.A., 2015]. Однако динамика разных по происхождению и

функциональным характеристикам макрофагов при регенерации печени после субтотальной резекции не изучена.

Установлено, что при повреждении печени в нее мигрируют мультипотентные стромальные клетки-предшественники из красного костного мозга и других органов [Chen F.-M. et al., 2011]. Точные механизмы влияния мультипотентных стромальных клеток (МСК) на регенерацию печени неизвестны. Считается, что МСК могут дифференцироваться в клетки печени или выделять множество биологически активных веществ, стимулирующих репаративные процессы в печени [Wu X.-B., Tao R., 2012]. Однако влияние МСК на регенерацию печени после субтотальной резекции изучено недостаточно.

Таким образом, молекулярные механизмы пролиферативных процессов, роль прогениторных клеток и разных популяций макрофагов при субтотальной резекции печени не изучены, также как и участие в регенераторном процессе других органов (легких, почек). Эти данные представляют интерес в клиническом аспекте, так как понимание механизмов регенерации печени при субтотальной резекции позволит разработать новые подходы к стимуляции регенераторных процессов.

Цель работы – изучение молекулярных и клеточных механизмов регенерации печени крыс после ее субтотальной резекции.

Задачи исследования

1. Изучить динамику пролиферации гепатоцитов после субтотальной (80%) резекции печени у крыс, оценить соотношение процессов клеточной пролиферации и клеточной гибели.
2. Исследовать динамику экспрессии генов ключевых цитокинов и факторов роста, регулирующих репаративные процессы в печени крыс после субтотальной резекции.

3. Изучить участие прогениторных клеток и активность генов TWEAK/Fn14 и NOTCH-сигнального пути, определяющих их дифференцировку в гепатоциты.
4. Установить роль субпопуляций M1 и M2 макрофагов, резидентных макрофагов и макрофагов - производных моноцитов крови в восстановлении массы печени после субтотальной резекции.
5. Охарактеризовать динамику экспрессии генов про- и противовоспалительных цитокинов и факторов роста, регулирующих пролиферацию гепатоцитов, в легких и почках при регенерации печени после субтотальной резекции.
6. Оценить влияние трансплантации МСК пупочного канатика на ключевые молекулярные и клеточные механизмы регенерации печени после субтотальной резекции.

Научная новизна

Впервые установлено, что блок митотического цикла гепатоцитов в течение 30 часов после субтотальной резекции происходит при выходе из G₀-периода, что связано с низким содержанием фактора некроза - TNFα и гепатоцитарного фактора роста - HGF в печени. При этом временный блок пролиферации не сопровождается апоптотической гибелью гепатоцитов.

При удалении 80% массы печени крыс наблюдается масштабная пролиферация гепатоцитов, характеризующаяся двумя пиками митотической активности гепатоцитов, ранним — через 2 суток после резекции, и поздним — через 7 суток. Длительная пролиферация обеспечивается экспрессией в гепатоцитах транскрипционного фактора малодифференцированных клеток SOX9.

Субтотальная резекция печени приводит к повышению экспрессии генов-регуляторов регенерации – *il6*, *hgf*, *fgf2* и др., как в ней, так и в легких и почках. В печени после субтотальной резекции выявлено два периода

повышенной активности исследуемых генов цитокинов и факторов роста: ранний – 3-48ч (гены *il6*, *il10*, *inos*, *mmp9*, *fgf2*, *tgfb*, *fn14*), поздний - 5-10-е сутки после операции (гены *il1b*, *tnfa*, *tweak*, *inos*, *hgf*), что соответствует двум пикам митотической активности гепатоцитов. В легких и почках в течение 30 ч после субтотальной резекции повышается экспрессия генов провоспалительного цитокина *il6*, противовоспалительного *il10*, генов факторов роста, регулирующих пролиферацию гепатоцитов – *hgf* (фактора роста гепатоцитов), *fgf2* (фактора роста фибробластов), что необходимо для стимуляции пролиферации гепатоцитов.

В процессе регенерации печени после субтотальной резекции отсутствуют клетки с промежуточным между холангиоцитами и гепатоцитами фенотипом, а также наблюдается снижение экспрессии генов *notch1* и *notch2* NOTCH-сигнального пути, что свидетельствует о том, что активация прогениторных клеток печени или трансдифференцировка гепатоцитов в холангиоциты не наблюдается. В соответствии с полученными данными ведущим механизмом регенерации печени после субтотальной резекции является пролиферация гепатоцитов.

После удаления 80% массы печени у крыс происходит активация системы макрофагов – увеличение их пролиферации, активацией в них экспрессии генов цитокинов *il1b*, *il6*, *il10*. При этом все макрофаги печени представлены резидентными клетками, которые имеют фенотип прорегенераторных макрофагов.

Трансплантация мультипотентных стромальных клеток стимулирует восстановительные процессы в печени за счет усиления пролиферации гепатоцитов, при этом, введенные мультипотентные стромальные клетки не дифференцируются в какой-либо из типов клеток печени и полностью элиминируются макрофагами уже на 3-и сутки.

Научно-практическая значимость

В работе раскрыты молекулярные и клеточные механизмы регенерации печени после ее субтотальной резекции. Выявлен блок митотического цикла в ранние сроки после субтотальной резекции печени, обусловленный низким содержанием фактора некроза - $\text{TNF}\alpha$ и гепатоцитарного фактора роста - HGF в печени, установлено компенсаторное повышение экспрессии регуляторных генов в легких и почках. Исходя из полученных данных, ключевыми звеньями, на которые необходимо воздействовать для стимуляции репаративного процесса, является популяция макрофагов печени, которая индуцирует пролиферацию гепатоцитов, синтезируя $\text{TNF}\alpha$, и звездчатые клетки, секретирующие HGF, а также легкие и почки, как дополнительные источники синтеза HGF.

Показана принципиальная возможность коррекции нарушения регенерации после субтотальной резекции печени с помощью МСК пупочного канатика, которые оказывают паракринный эффект. Получены данные, открывающие перспективы для использования клеточной терапии пациентов с синдромом малого остатка печени. Для разработки эффективных методов клеточной терапии заболеваний печени необходимо учитывать полученные данные о миграции и скорости элиминации МСК при их трансплантации в селезенку.

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 03.03.04 клеточная биология, цитология, гистология согласно пунктам 1, 2, 5, 6.

Методология и методы исследования заключается в системном и комплексном анализе научных трудов отечественных и зарубежных ученых в области молекулярных, клеточных механизмов регенерации, пролиферации и клеточной гибели, клеточных технологий, которые сформировали основные положения учения о регенерации печени млекопитающих, влиянии объема резекции на репаративные процессы, представление о синдроме малого

остатка печени. В работе использованы следующие методы: модель регенерации печени после субтотальной резекции у крыс, культивирование клеток млекопитающих (первичных культур и перевиваемых линий), цитохимическое и иммуноцитохимическое окрашивание, обзорное и иммуногистохимическое окрашивание, морфометрические методы, световая и флуоресцентная и микроскопия, проточная цитофлуориметрия, иммуноферментный анализ, ПЦР-РВ, вестерн-блот, статистический анализ.

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность результатов обеспечивается последовательным и логичным изложением задач исследования, их решением, использованием современных апробированных методов исследования, корректностью применения, достаточным объемом данных для каждой экспериментальной группы, достаточным количеством групп сравнения в экспериментах, адекватным применением методов статистического анализа, критической оценкой полученных результатов при сравнении с данными современной научной литературы.

Материалы диссертации доложены на научной конференции EMBO Workshop on Liver and Pancreas Development, Function and Diseases (26-30May, 2013, Athens, Greece), 1 Национальном конгрессе по регенеративной медицине(4-6 декабря 2013, Москва), «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2014 г.), Joint IUBMB/MiP Symposium on Mitochondrial Physiology – a Point/Counterpoint Meeting (8-12 Sept., 2014, Австрия), 2 Национальном конгрессе по регенеративной медицине (4-5 декабря 2015, Москва), Международной научной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2016 г.), межлабораторной конференции ФГБНУ НИИМЧ (Москва, 22 декабря 2016г).

Личное участие автора заключалось в планировании и проведении исследования, статистической обработке, обобщении и анализе полученных результатов, подготовке публикаций.

Внедрение результатов исследования.

Результаты исследования внедрены в учебный процесс на кафедре гистологии, эмбриологии и цитологии ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Минздрава России, ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов».

Положения, выносимые на защиту

1. Установлены молекулярные и клеточные механизмы регенерации печени после субтотальной резекции у крыс. В течение 30 часов после резекции обнаружен временный блок митотического цикла гепатоцитов, который не приводит к повышению уровня апоптоза. Причиной митотического блока гепатоцитов является низкое содержание фактора некроза опухолей TNF α и фактора роста гепатоцитов HGF, что компенсаторно приводит к активации синтеза HGF в легких и почках.
2. Выявлено два пика митотической активности гепатоцитов: ранний - через 48-72 часа, и поздний - через 7 суток после субтотальной резекции, которым соответствуют два периода повышения активности генов цитокинов и факторов роста, регулирующих пролиферацию гепатоцитов.
3. Основным механизмом регенерации печени крыс после субтотальной резекции является пролиферация гепатоцитов, а не активация резидентных прогениторных клеток. Экспрессия транскрипционного фактора малодифференцированных клеток SOX9 в гепатоцитах необходима для поддержания длительной и масштабной пролиферации.
4. Субтотальная резекция вызывает активацию популяции макрофагов печени, что проявляется в увеличении общего числа макрофагов (CD68+клеток) за счет их пролиферации и активации экспрессии генов цитокинов *il1b*, *il6*, *il10* в них.
5. Трансплантация мультипотентных стромальных клеток в селезенку приводит к стимуляции регенерации печени после ее субтотальной резекции,

что характеризуется увеличением выживаемости крыс, стимуляцией пролиферации гепатоцитов, ускорением нормализации энергетического обмена митохондрий гепатоцитов. Трансплантированные мультипотентные стромальные клетки в течение трех суток элиминируются преимущественно за счет фагоцитоза макрофагами.

Публикации: По материалам диссертации опубликовано 17 работ, из них 12 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем диссертации.

Диссертационная работа изложена на 233 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения и выводов.

Работа иллюстрирована 54 рисунками и 5 таблицами. Список литературы включает 287 источника из них 20 отечественных и 267 зарубежных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 РЕГЕНЕРАЦИЯ ПЕЧЕНИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ПОСЛЕ ЧАСТИЧНОЙ ГЕПАТЭКТОМИИ

Различным аспектам регенерации печени млекопитающих посвящено множество работ, как в отечественной, так и зарубежной литературе [Сидорова В.Ф., Рябинина З.А., Лейкина Е.М., 1966, Michalopoulos G.K., DeFrances M.C., 1997, Michalopoulos G.K., 2010]. Классической моделью для изучения регенерации печени млекопитающих является восстановление массы органа после резекции 70% по методу Higgins G.M. и Anderson R.M. (1931) [Higgins, G. M., Anderson, R. M., 1931, Сидорова В.Ф., Рябинина З.А., Лейкина Е.М., 1966, Palmes D., Spiegel H.-U., 2004]. Регенерация печени после такой резекции осуществляется по способу регенерационной гипертрофии, то есть восстановление массы органа происходит за счет пролиферации гепатоцитов, но при этом удаленные доли не формируются заново [Сидорова В.Ф., Рябинина З.А., Лейкина Е.М., 1966]. Такой способ регенерации обнаружен и у печени плодов крысы [Ельчанинов А.В., Большакова Г.Б., 2010].

На срок восстановления исходной массы органа влияет множество факторов, при этом решающую роль играет возраст животного. Так, у молодых неполовозрелых крыс (масса тела до 100 г) восстановление исходной массы печени после резекции происходит к 5-6 дню после операции [Bucher N.R., Swaffield M.N., DiTroia A.F., 1964, Сидорова В.Ф., Рябинина З.А., Лейкина Е.М., 1966, Tannuri A.C.A. et al., 2007]. У взрослых крыс (масса тела 100-200 г) масса печени восстанавливается к 9-14 дню, а у старых (масса тела свыше 250 г) – к 22 дню после частичной гепатэктомии

операции [Сидорова В.Ф., 1969, 1976]. У 17-суточных плодов крысы после резекции примерно 20% печени масса органа восстанавливается через 2 суток после операции [Ельчанинов А.В., Большакова Г.Б., 2010].

Полноценное восстановление того или иного органа после утраты части тканей может осуществляться за счет размножения клеток, за счет их полиплоидизации или их гипертрофии в остатке органа [Бродский В.Я., Урываева И.В., Stanger B.Z., 2008].

Печень восстанавливается после резекции в основном за счет пролиферации и полиплоидизации гепатоцитов. Последовательность генов, экспрессия которых повышается при регенерации печени определяется реакцией органа на острую травму и следующей за ней фазой восстановительного процесса [Fausto N., 2000, Michalopoulos G.K., 2010]. Исходя из этого первыми повышается экспрессия про- и противовоспалительных цитокинов (TNF α Il6, Il1b, Il10) регулирующих вступление гепатоцитов в митотический цикл, а позднее увеличивается экспрессия факторов роста (HGF, EGF и др.), обеспечивающих прохождение гепатоцитами митотического цикла [Fausto N., 2000, Michalopoulos G.K., 2010].

В соответствии с литературными данными TNF α и Il6 синтезируются макрофагами печени и образуют регуляторную систему, которая стимулирует в гепатоците экспрессию так называемых генов раннего ответа, что приводит к вступлению клетки в митотический цикл [Fausto N., 2000, Fausto N. Et al., 2006]. Помимо прочего, показано, что TNF α /Il6 стимулируют образование iNOS, которая вместе с NO защищает гепатоциты от высокого уровня TNF α /Il6 [Rai et al., 1998]. Кроме того, в настоящее время появились данные о том, что Il6 индуцирует синтез HGF, который, помимо стимуляции пролиферации эпителиальных клеток, подавления

апоптоза, вместе с IL10 оказывает противовоспалительный эффект [Yin et al., 2011]. Роль регенерации печени IL1b и IL10 в настоящее время активно изучается, показано, что данные цитокины подавляют пролиферацию гепатоцитов и, таким образом, вместе с TGFb приводят к завершению восстановительных процессов в печени [Michalopoulos G.K., 2010, Yin et al., 2011].

Считается, что прохождение гепатоцитами митотического цикла обеспечивается фактором роста гепатоцитов (HGF). Обнаружено, что у крыс в первый час после частичной гепатэктомии концентрация HGF в плазме крови повышается более чем в 20 раз и остается на этом уровне в течение 72 часов, далее постепенно возвращается к нормальным значениям [Fausto N. et al., 2006, Michalopoulos G.K., 2007, 2010].

HGF синтезируется в печени звездчатыми клетками, неактивная форма HGF в больших количествах содержится в матриксе соединительной ткани печени, особенно в перипортальной области печеночной долики [Michalopoulos G.K., DeFrances M.C., 1997]. После нанесения травмы печени в плазме повышается уровень урокиназы, которая запускает каскад протеолитических реакций, приводящих к деградации межклеточного матрикса печени, что приводит к активации и высвобождению HGF [Michalopoulos G.K., 2007, 2010, Shanmukhappa K. et al., 2009, 56]. Главная роль в этом процессе принадлежит семейству матриксных металлопротеиназ [Knittel T. et al., 2000, Olle E.W. et al., 2006].

В большинстве работ изучают роль звездчатых клеток печени и синтезируемого ими HGF, то есть, так называемого эндогенного для печени HGF. Однако показано, что после 70% резекции печени *hgf* начинает активно экспрессироваться не только в самом регенерирующем органе, но еще в клетках стромы легких, почек и селезенки [Yanagita K. et al., 1992, Kono S. Et al., 1992], возможно, за счет способности IL6 индуцироваться экспрессию *hgf* [Coudriet G.M. et al., 2010]. Роль факторов роста и цитокинов,

синтезируемых вне печени после субтотальной гепатэктомии, зависит от объема их синтеза, от того, действуют ли они местно или секретируются в кровотоки. Необходимо учитывать, что локальное повышение экспрессии этих генов в легких и почках может быть обусловлено их повреждением продуктами обмена при печеночной недостаточности, и может не влиять на регенерацию печени.

Другими факторами роста, вызывающим активацию пролиферации гепатоцитов в печени после резекции являются эпидермальный фактор роста (EGF) и трансформирующий фактор роста- α (TGF- α) [Tomiya T. et al., 2000]. Удаление слюнных желез у крыс вызывает снижение концентрации EGF в крови животных, что ведет за собой снижение восстановительных процессов в печени. TGF α синтезируется гепатоцитами и оказывает аутокринное влияние. Предполагается, что EGF действует на ранних этапах регенерации печени, в то время как TGF α на более поздней стадии восстановительного процесса, поскольку было показано, что активность его синтеза достигает пика только через 24 ч после резекции [Michalopoulos G.K., DeFrances M.C., 1997, Michalopoulos G.K., 2007, 2010].

Конечным итогом действия выше перечисленных факторов роста является активация экспрессии так называемых ранних генов, в состав которых входит семейство протоонкогенов, активность которых побуждает клетку к делению [Fausto N. Et al., 2006, Michalopoulos G.K., 2007, 2010].

Пролиферация гепатоцитов при регенерации печени имеет ряд особенностей. Во-первых, существует так называемый латентный период пролиферации, который сильно зависит от возраста особи. У молодых животных после резекции печени пролиферация активируется раньше по сравнению с более взрослыми особями. Так, митотическая активность гепатоцитов у 5-дневных крысят повышается через 20 ч после операции, у 4-6-недельных крыс — через 24 ч, у 4-6-месячных — через 48 ч, у 16-месячных — через 72 ч [Bucher N.R., Glinos A.D., 1950, Сидорова В.Ф., 1976].

При обширной резекции печени после начала пролиферации гепатоцитов показатели клеточного деления, как правило, достигают наибольшего значения, а далее постепенно снижаются. От возраста животного зависит время достижения пика пролиферации, а также количество таких пиков. У новорожденных крыс наблюдается 2 пика пролиферации. Показано, что у молодых особей пролиферация достигает наибольшего уровня раньше, чем у более взрослых животных [Bucher N.R., Glinos A.D., 1950, Bucher N.R., Swaffield M.N., DiTroia A.F., 1964].

У 17-суточных плодов крысы после резекции 20% массы печени митотическая деление гепатоцитов активизируется через 9 ч после операции, наибольшего значения митотический индекс достигает через 12 ч и 24 ч после нанесения повреждения [Ельчанинов А.В., Большакова Г.Б., 2010,2011]. Таким образом, в регенерирующей печени плодов и новорожденных крысы наблюдается два пика пролиферации гепатоцитов [Bucher N.R., Swaffield M.N., DiTroia A.F., 1964].

Вариабельность латентного времени пролиферации и времени наступления пика клеточного размножения в регенерирующей печени у животных разных возрастных групп, по-видимому, зависит от уровня экспрессии факторов, подавляющих клеточное деление. В печени плодов крыс перед рождением начинает синтезироваться ингибитор пролиферации C/EBP α , что приводит с возрастом к постепенному уменьшению митотической активности гепатоцитов [Timchenko N.A. et al., 1999]. Показано также, что у молодых животных после частичной гепатэктомии экспрессия C/EBP α и ингибитора циклинзависимых киназ p21 резко снижается, чего не происходит у старых животных [Timchenko N.A. et al., 2009]. Вероятно, меньший уровень C/EBP α , а также быстрое снижение экспрессии C/EBP α и p21 после резекции печени определяет более раннее начало пролиферации гепатоцитов при регенерации печени у молодых особей. По этой же причине, у молодых животных пик митозов гепатоцитов

наблюдается при резецировании меньшего количества паренхимы печени по сравнению с взрослыми особями. Так, у взрослых крыс для этого необходимо удалить примерно 40% массы печени, а у крысят в раннем постнатальном периоде 20% [Bucher N.R. et al., 1964, Lambotte L. et al., 1997]. У 17-суточных плодов крысы пролиферация гепатоцитов активизируется после резекции примерно 20 % массы [Ельчанинов А.В., Большакова Г.Б., 2010, 2011].

Второй особенностью пролиферации гепатоцитов в регенерирующей печени млекопитающих является то, что в ходе восстановления массы печени происходит сокращение длительности фаз митотического цикла гепатоцитов [Сидорова В.Ф., 1976]. Это, видимо, связано с тем, что в гепатоцитах происходит активация экспрессии циклинов, циклин-зависимых киназ и резкое снижение уровня их ингибитора - белка p 21 [Fausto N., 2006].

Третья особенность пролиферации гепатоцитов при регенерации печени заключается в суточной периодичности их митотической активности, при этом наибольшее количество митозов приходится на 6-9 ч утра [Сидорова В.Ф. и др., 1966]. Циркадный ритм пролиферации в печени формируется только через 1 месяц после рождения [Бабаева А.Г., 2009, Barbason H. Et al., 2003], что соответствует времени установления суточной активности так называемых генов биологических часов (Bmal-1, Clock, Per1-2, Cry1-2) в печени [Yamazaki S. et al., 2009, Sládek M. et al., 2006].

Неотъемлемым компонентом регенерации печени млекопитающих является повышение ploидности гепатоцитов [Бродский В.Я., Урываева И.В., 1981, Сакута Г.А., и др., 2011, Celton-Morizur S., Desdouets C., 2010]. На крысах было показано, что в ходе регенерации печени молодых животных повышается доля в основном тетра- и октаploидных гепатоцитов, тогда как у стареющих крыс заметно увеличивалось число ядер гепатоцитов с 16n и 32n [Рябинина З.А., Бенюш В.А., 1973].

Явление полиploидии широко распространено в живой природе среди животных, растений и грибов [Бродский В.Я., Урываева И.В., 1981].

Полиплоидия рассматривается как вариант пролиферации, при котором митотический цикл осуществляется не до конца. Однако причины ее появления в ходе эволюции по-прежнему неясны. Возможно, полиплоидные клетки обладают преимуществами по сравнению с диплоидными. Одним из них является генетическая защищенность клетки, поскольку увеличение числа повторяющихся геномов препятствует проявлению генетических нарушений [Бродский В.Я., Урываева И.В., 1981, Anatskaya O.V., Vinogradov A.E., 2007].

В настоящее время предполагают, что повышение плоидности гепатоцитов печени является механизмом защиты наследственного материала от окислительного повреждения [Anatskaya O.V., Vinogradov A.E., 2007]. Показано, что увеличение функциональной нагрузки на печень, например, при переходе крысят от грудного вскармливания к самостоятельному питанию твердой пищей или после частичной гепатэктомии, сопровождается повышением плоидности гепатоцитов [Gorla G.R. et al., 2001, Margall-Ducos G. et al., 2007]. Кроме того, в указанных случаях в гепатоцитах отмечают признаки оксидантного стресса: снижение общего содержания глутатиона, активности каталазы, окислительное повреждение ДНК (появление 8-гидроксигуанина) и повышение уровня пероксидного окисления липидов [Gupta S., 200, Sigal S.H. et al., 1999]. Таким образом, полиплоидизация — это реакция органа на повышенную функциональную нагрузку.

Образование двуядерных клеток в результате ацитокинетического митоза является ключевым этапом в процессе полиплоидизации гепатоцитов [Nadal C., Zajdela F., 1966, Guidotti J.-E. et al., 2003]. Сборка митотического веретена и цитотомия в процессе митоза регулируются в клетке ингибитором циклинзависимых киназ белком p21, которому в настоящее время отводится главная роль в процессе полиплоидизации. Об этом свидетельствуют следующие факты: у взрослых крыс начало

полиплоидизации гепатоцитов после частичной гепатэктомии совпадает с возобновлением экспрессии p21; у трансгенных мышей с повышенной активностью p21 уровень полиплоидизации выше. Кроме того, повышение плоидности гепатоцитов с возрастом животного сочетается с увеличением экспрессии белка p21, а также другого ингибитора пролиферации C/EBP α [Gupta S., 2000, Timchenko N.A., 2009]. Таким образом, система циклинзависимых киназ, связанный с ними белок p21, а также фактор транскрипции C/EBP α играют ключевую роль в пролиферации гепатоцитов как при регенерации, так и при нормальном росте.

Помимо митотического размножения гепатоцитов, увеличение размеров гепатоцитов может вносить вклад в восстановление массы печени после резекции. Истинной гипертрофией клеток принято считать рост цитоплазмы, который не сопровождается увеличением плоидности ядра [Бродский В.Я., Урываева И.В., 1981]. Вклад митотического деления гепатоцитов и их гипертрофии в регенерацию печени зависит от возраста животного. В раннем постнатальном периоде масса печени восстанавливается в основном за счет гиперплазии гепатоцитов, а у взрослых и стареющих животных все большее значение приобретает гипертрофия [Timchenko N.A., 2009]. При регенерации печени плодов крысы гипертрофия гепатоцитов по сравнению с контролем не обнаружена [Ельчанинов А.В., Большакова Г.Б., 2012]. В связи с этим особый интерес представляют данные о том, что в раннем постнатальном периоде наблюдается интенсивный рост цитоплазмы гепатоцитов, не связанный с синтезом ДНК [Шалахметова Т.М. и др., 1981, Делоне Г.В. и др., 1987]. Таким образом, гипертрофия гепатоцитов вносит значительный вклад в рост печени на этом этапе развития, однако, как элемент восстановления массы печени после резекции, видимо, отсутствует.

Увеличение размеров клеток при регенерации рассматривается как способ восстановления утраченной массы органа, альтернативный митозу,

особенно в том случае, когда клеточное деление по каким-либо причинам невозможно [Nagy P. et al., 2001, Timchenko N.A., 2009], например, в печени стареющих животных, у которых митоз в гепатоцитах часто необратимо блокирован [Iakova P. Et al., 2003, Gielchinsky Y. et al., 2010]. Напротив, в пренатальном периоде гепатоциты легко вступают в митоз [Timchenko N.A. et al., 1999], что, видимо, исключает возможность гипертрофии.

В основе феномена гипертрофии гепатоцитов лежат следующие молекулярные механизмы. Обнаружено, что у интактных молодых мышей размножение гепатоцитов обратимо блокирует ингибитор пролиферации C/EBP α . У старых особей в печени накапливается модифицированный C/EBP α , который необратимо репрессирует E2F-зависимые промоторы и их гены. Смена способа подавления митотического размножения гепатоцитов с возрастом приводит к увеличению вклада их гипертрофии в регенерацию печени [Iakova P. Et al., 2003, Gielchinsky Y. et al., 2010].

Возраст животного играет важную роль в формировании внутренней структуры регенерирующей печени. Это, прежде всего, относится к возможности новообразования печеночных долек в ходе регенерации печени. Показано, что формирование новых долек после резекции печени у крыс возможно только в возрасте до двух недель постнатальной жизни. Это, видимо, связано с тем, что в это время в интактной печени также идет интенсивное образование долек. При резекции печени у крыс в возрасте 24-28 дней (в это время процесс образования печеночных долек уже завершен) регенерировавшая печень состоит в основном из гипертрофированных долек, то есть образования новых долек не происходит [Сидорова В.Ф., 1969]. Подобные данные были получены и на свиньях [Ladurner R. et al., 2009].

После того как в процессе репаративной регенерации масса печени достигает исходных значений, восстановительный процесс завершается. Фактором, который, по-видимому, прекращает репаративные процессы в печени, является TGF- β 1 [Fausto N. 2000, Michalopoulos G.K., 2007],

поскольку было показано, что он ингибирует пролиферацию в культуре гепатоцитов. Концентрация TGF- β 1 в плазме крови постепенно нарастает после частичной гепатэктомии и достигает стабильно высокого уровня через 48-72 часа. Однако точные механизмы влияния TGF- β 1 на гепатоциты по-прежнему до конца не выяснены [Sánchez A., Fabregat I., 2010].

После частичной гепатэктомии в постнатальном периоде в печени млекопитающих наряду с активацией пролиферации отмечается также усиление апоптоза гепатоцитов. Одной из причин гибели клеток может быть оксидантный стресс, признаки которого обнаруживаются в печени после резекции [Azad N. et al., 2010], а также повреждающее действие на гепатоциты TNF α [Tian Y. et al., 2006].

До настоящего времени мало исследованы механизмы, которые запускают процессы регенерации и регулируют их течение в зависимости от утраты массы органа.

Предполагается, что организм получает сигнал об уменьшении размеров печени при участии желчных кислот [Huang W. et al., 2006]. Как известно, между печенью и кишкой происходит кишечно-печеночная циркуляция желчных кислот. Резекция печени вызывает относительное увеличение входящего тока желчных кислот в орган из кишечника, что активирует ядерные рецепторы, в том числе FXR и связанные с ним сигнальные пути, стимулирующие рост печени. После того как исходная масса печени достигнута, относительный ток желчных кислот из кишечника нормализуется. Активация соответствующих ядерных рецепторов прекращается, и экспрессия связанных с этими рецепторами генов возвращается к базальному уровню. Рост печени после резекции рассматривают как гомеотрофический, то есть рост, восстанавливающий функциональную способность органа и гомеостаз [Stanger B.Z., 2008,2015].

Таким образом, можно сделать вывод о том, что желчные кислоты играют важную роль в регуляции репаративного роста печени. Однако

требуется дальнейшее изучение вопроса, о том, как соотносится этот регуляторный каскад с функцией основных факторов роста, которые участвуют в регенерации печени. Кроме того, неизвестна роль желчных кислот в регуляции роста печени в пренатальном периоде [Huang W. et al., 2006].

Фактором, который тесно связан с печеночно-кишечной циркуляцией желчных кислот является портальная печеночная гемодинамика. Показано, что после 70% резекции печени кровоток в портальной системе утраивается на единицу массы. Таким образом, на оставшиеся гепатоциты воздействует больше факторов, которые поступают из селезенки и кишечника в печень. Однако установлено, что стимулирующее влияние на регенерацию оказывает не только биологически активные вещества, попадающие в печень по портальной системе, но и также и повышение кровяного давления в портальной системе. Установлено, что при поддержании давления крови в портальной системе на исходном уровне с помощью шунта (отсутствует повышение давления крови в портальной системе) после резекции 70% массы печени у таких животных наблюдается повышение уровня апоптоза в печени, экспрессии $\text{TNF}\alpha$ и IL6 , нарушение процесса активации HGF [Marubashi S. et al., 2004].

Несмотря на значительные успехи в понимании молекулярных механизмов регенерации печени млекопитающих, в настоящее время в данной области знаний остается много проблем, решение которых позволит приблизиться к направленному влиянию на восстановительные процессы в организме млекопитающих. Основной проблемой является выяснение механизмов оценки размера наносимого повреждения и регуляции размеров регенерирующего органа.

1.2 ВЛИЯНИЕ ОБЪЕМА РЕЗЕКЦИИ ПЕЧЕНИ НА ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЙ ПРОЦЕСС

Одним из факторов, оказывающих существенное влияние на ход восстановительного процесса в печени является объем наносимой травмы. Наибольшее количество исследований посвящено регенерации печени после 70 % резекции [Michalopoulos G. K., 2010], значительно меньше работ, касающихся изучения регенерации при малой резекции – удаление примерно 30% массы органа и после субтотальной резекции – удаление более 80% органа [Lambotte L. et al., 1997, Palmes D., Spiegel H.-U., 2004]. Выяснение молекулярных и клеточных механизмов регенерации печени после резекции разных объемов позволяет лучше понять механизмы, участвующие в оценке объема повреждения печени.

Наиболее заметным цитологическим процессом, на который оказывает влияние объем резекции является пролиферация гепатоцитов, в том числе их полиплоидизация [Сидорова В.Ф., 1966, Романова Л.К., 1984].

Для того, чтобы вызвать минимальную волну пролиферации гепатоцитов необходимо удалить примерно 10% тканей печени [Bucher N.R., Swaffield M.N., 1964, Сидорова В.Ф., 1966,]. Характерной чертой митотической активности гепатоцитов при малых резекциях является то, что она протекает без достижения пиковых показателей, то есть не происходит выраженной синхронизации митотических циклов гепатоцитов. Этот факт послужил основанием для некоторых авторов рассматривать восстановление массы печени после такой резекции (10-30% паренхимы печени) как своеобразную модель нарушения регенерации [Mitchell C. et al., 2005]. Считается, что подобная динамика пролиферации объясняется более поздним наступлением пика активности основных факторов роста и циклинов D1, A, E [Mitchell C. et al., 2005]. На основании этого некоторые авторы рассматривают пролиферацию гепатоцитов после малых резекций (10-30%

паренхимы печени) как своеобразную модель нарушения митотического цикла гепатоцитов, при котором не возможна синхронизация пролиферации клеток [Lambotte L. et al., 1997, Li J. et al., 2009]. Напротив, при резекции 70% и более тканей печени наблюдается так называемый пик пролиферации гепатоцитов. У взрослых животных обычно отмечается один наиболее заметный пик пролиферации гепатоцитов, приходящийся на 24-28 часов после резекции печени, иногда отмечают второй, меньший, подъем клеточного размножения примерно через 48 часов после операции. Наиболее отчетливо второй пик пролиферации гепатоцитов обнаруживается у молодых животных, у которых он также приходится на конец вторых суток регенерации [Bucher N.R., Glinos A.D., 1950, Сидорова В.Ф., 1966,]. На количество волн митотического размножения гепатоцитов, видимо, также оказывает влияние видовой принадлежность экспериментального животного, так у мышей после 70% резекции обнаружено 4 митотических волны в течение 7 суток после операции [Zou Y. et al., 2012]. Исходя из изложенных данных можно сделать вывод, что чем больше объем резекции печени, тем выраженнее пролиферация гепатоцитов. Однако при резекции 80% и более тканей печени наблюдается задержка наступления волны митотической активности гепатоцитов, вследствие блока митотического цикла при переходе из G0 в G1, а также из G2 к митозу [Романова Л.К., 1984]. Кроме того, значение митотического индекса гепатоцитов не превышает значения митотического индекса гепатоцитов после 70% резекции [Романова Л.К., 1984]. По данным некоторых авторов, при субтотальной резекции, также как и при малых резекциях, отсутствует пик пролиферации гепатоцитов [Романова Л.К., 1984], по данным других авторов он отмечается примерно через 39 часов после операции [Weinbren K., Taghizadeh A., 1964].

Если рассматривать влияние объема резекции на процесс полиплоидизации, то в общем можно заключить, что чем больше количество

удаляемых тканей, тем выше степень полиплоидизации регенерирующей печени [Сидорова В.Ф., 1966, Романова, 1984].

Объем резекции сильно оказывает влияние на динамику экспрессии генов молекул, регулирующих регенерацию печени млекопитающих. При сравнительном изучении экспрессии генов раннего ответа *c-myc*, *c-fos* и *c-met* после резекции 70% и 85% установлено, что указанные гены активируются после обоих видов операции и динамика их экспрессии также сходная [Panis Y. et al., 1998]. Подобные данные были получены и при изучении регенерации печени после резекции 30 % ее массы [Fausto N., et al., 2009]. Многие авторы связывают экспрессию генов раннего ответа с влиянием на гепатоциты цитокинов, таких как И1, И6, TNF α [Fausto N., 2006]. Результаты, полученные при изучении роли этих цитокинов в регенерации печени после 30% и 80% резекции, согласуются с данными по экспрессии генов раннего ответа. Показано, что после обоих видов операции происходит активация синтеза указанных цитокинов в печени, при этом экспрессия гена И6 оказывается выше после 80%-й резекции [Scotté M. et al., 1997]. Однако другая картина наблюдалась после 90% резекции печени. Отмечена более поздняя по сравнению с 70% резекцией активация экспрессии фактора транскрипции NF- κ B, а также TNF α . По мнению авторов, подобные нарушения на начальных этапах регенерации печени приводят к подавлению и замедлению восстановительного процесса [Sowa J.P. et al., 2008]. Однако остается непонятным, почему при сходстве оказываемых на печень эффектов 80% и 90% резекций (блок пролиферации), не было обнаружено сходных изменений экспрессии цитокинов [Scotté M. et al., 1997, Sowa J.P. et al., 2008].

Еще более неожиданные результаты были получены при блокаде TNF α и И1 после резекции 90% массы печени. Подобное воздействие улучшало функции печени и ускоряло ее регенерацию [Tsutsumi R. et al., 2004]. Механизм такого влияния блокады цитокинов на восстановление массы печени остается непонятным.

Как уже отмечалось, после прохождения фазы прайминга, гепатоциты становятся чувствительными к факторам роста, которые побуждают их к переходу из G1- в S-период. Наиболее сильным митогеном для гепатоцитов является HGF. Обнаружено, что пик экспрессии этого фактора роста после 30% и 80% резекции обнаруживается позже, чем после удаления 70% массы печени. Примерно такие же данные были получены и об экспрессии TGF α и TGF β [Masson S. et al., 1997, Scotte M. et al., 1999, Sowa J.P. et. al., 2008]. В соответствии с данными других авторов, напротив, наибольший уровень экспрессии HGF после удаления 85% наблюдается раньше, чем при регенерации печени после удаления 70% массы органа [Panis Y. et al., 1998]. Однако при изучении экспрессии данного фактора роста после 70% и 90% резекции не было выявлено различий [Sowa J.P. et al., 2008].

Факторы роста, влияя на гепатоциты, вызывают в них экспрессию циклинов, тем самым обеспечивая прохождения клетками митотического цикла. Наибольший уровень экспрессии циклинов D1, A, E после резекции 80% массы печени отмечается позже по сравнению с таковой при резекции 70% паренхимы печени, еще позже отмечается пик экспрессии указанных циклинов после удаления 30% тканей печени. Несмотря на разные сроки достижения наибольшего уровня экспрессии, после резекции того или иного объема отмечается сходная динамика активности генов рассматриваемых циклинов [Masson S. et al., 1999]. Однако другие авторы указывают, что после малой резекции в 30% определялась минимальная экспрессия циклинов A, E [Li J. et al., 2009]. Также отмечается, что после резекций разного объема обнаруживаются не столь качественные, сколько количественные различия в молекулярных механизмах регенерации печени [Li J. et al., 2009].

При анализе транскриптомов печени после 30% и 70% резекции было выявлено, что как при малой, так и при более обширной резекции происходит масштабное изменение экспрессии генов. Была выявлена группа

генов, чья экспрессия колебалась более сильно при 70% резекции по сравнению с 30%. Наибольшее количество таких генов приходилось на период 4-12ч после операции. Предполагается, что в данную группу входят гены, регулирующие ремоделирование хроматина. Видимо, именно в этой временной промежутке происходит выбор программы регенерации, которая определяет более выраженную пролиферацию гепатоцитов после 70% резекции печени. Это выражается в том, что через 4 часа экспрессируются в основном гены, которые имеют сайт связывания для транскрипционных факторов: FOXD3, FOXI1 (FhK10), CDPCR1(CCAAT displacement protein/cut homeobox,CUTL1), ER, E2F-1, через 12 часов наиболее экспрессируются гены с сайтом связывания для таких транскрипционных факторов как c-jun, CCAAT CEBP- β box, Myb, Ets-1, Elk1, и USF [Li J. et al., 2009]. В сходных работах также были выявлены наборы известных и неизвестных генов, которые связаны с регенерацией печени после 70% резекции [Xu C.S. et al., 2004; Yasuyuki K. et al., 2003]. При этом дифференциально экспрессирующиеся гены были представлены разными кластерами генов, таких как гены ответа острой фазы, гены пролиферации, гены клеточной адгезии. Помимо распределения по разным кластерам дифференциально экспрессирующиеся гены группировались по принадлежности к той или иной фазе регенерации печени после 70% резекции: начальная фаза (прайминг) – 2-12ч, пролиферация гепатоцитов – 24-36ч и терминальная фаза – 72-168ч. Так было обнаружено, что среди генов острой фазы экспрессировались *socs3*, *lbp*, *rap*, *reg3a*, *a2m*, *sxcr4*, *mx1*, *mx2*. Гены, контролирующие пролиферацию гепатоцитов, активно экспрессируются в среднюю фазу регенерации печени после резекции 70% паренхимы. При этом данные гены представлены генами различных циклинов *ccna2*, *ccnb1*, *ccnb2*, *ccnd1*, *ccne1*, генами, управляющими карио- и цитокинезом *cdc20*, *cdc25b*, *cdc2a*, *cdca1*, *cdca2*, *cdca3*, *cdca8*, *kif11*, *kif15*, *kif22*, *kif23*, *kif2c*, *kifc1*. На терминальной стадии регенерации печени в гепатоцитах активно экспрессируются гены клеточной

адгезии, которые представлены генами проколлагена - *col14a1*, *1a1*, *1a2*, *3a1*, *4a1*, *4a2*, *5a1*, *5a2*, *6a2*, *8a1*, и генами белков межклеточных контактов *gja4*, *gjb6* [Xiang et al., 2011]. Кроме того, на терминальной стадии регенерации печени в гепатоцитах активизируется множество генов, входящих в TGF β /BMP-сигнального пути [Xiang et al., 2011, Xu C.S. et al., 2011].

Таким образом, резекция разных объемов печени вызывает разный пролиферативный ответ со стороны гепатоцитов. Ранее предполагалось, что объем будущей пролиферации определяется на самых ранних этапах послеоперационного периода. Однако в настоящее время установлено, что как при 30%, так и после 70% резекции в первые 4 часа активизируется экспрессия практически одинаковых генов. Наибольшие различия выявляются примерно через 12 часов после резекции того или иного объема, когда начинают экспрессироваться гены, регулирующие рост и пролиферацию. Отмечено, что многие гены, активность которых повышается после 70% резекции, не экспрессируются после 30% резекции [Lambotte L. et al., 1997, Li J. et al., 2009]. Механизмы, регулирующих переход из начальной неспецифической фазы регенерации печени к специфической неизвестны. Среди возможных биологически активных веществ, осуществляющих этот процесс называют HGF, TGF α ., а также HB-EGF, экспрессия которого после малой резекции снижена [Mitchell C. et al., 2005].

1.3 РОЛЬ МАКРОФАГОВ В РЕГЕНЕРАЦИИ

Макрофаги являются гетерогенной популяцией клеток, способных очень быстро изменять свой фенотип и функцию под действием сигнальных молекул. Активация макрофагов *in situ* может пойти в сторону провоспалительных M1 макрофагов или противовоспалительных M2 макрофагов [Murray P.J., Wynn T.A., 2011], которые отличаются не только по экспрессии специфических маркеров, но и по своей роли в иммунном ответе и функциональной активности [Martinez F.O., Gordon S., 2014]. Локальное смещение баланса M1/M2 типов макрофагов в сторону M2 в области повреждения значительно улучшает динамику и эффективность репаративных процессов, что продемонстрировано на моделях кожной раны [Okizaki S. et al., 2015], повреждения спинного мозга [Nakajima H. et al., 2012], инфаркта миокарда и кардиомиопатии [Singla D.K. et al., 2015] и некоторых других. Следует понимать, что изменение баланса может происходить как за счет подавления M1-пути активации, так и за счет стимуляции M2-пути активации. При этом часть макрофагов может оставаться в неактивированном состоянии [Murray P.J., Wynn T.A., 2011]. Таким образом, смещение баланса M1/M2 *in vivo* может быть обеспечено за счет блокирования IL-6, активирующего M1 макрофаги [Nakajima H. et al., 2012], введения IL-4 [Kiguchi N. et al., 2015] или IL-10, активирующих M2a и M2C типы соответственно [Wu J. et al, 2010].

Гетерогенность популяции макрофагов не исчерпывается только функциональными различиями, в настоящее время получены данные, указывающие на разность источников происхождения тканевых макрофагов [Chazaud B., 2014]. Показано, что в нормальных условиях в тканях обнаруживаются почти исключительно макрофаги эмбрионального происхождения, которые развиваются из клеток-предшественников, локализующихся в желточном мешке. Данный тип макрофагов имеет

фенотип Ly6CnegCCR2negCX3CR1hi. В условиях воспаления ткани инфильтрируют макрофаги, которые развиваются из моноцитов крови с фенотипом Ly6CposCCR2posCX3CR1lo, данный тип макрофагов в тканях синтезируют TNF α , IL-1, NO [Geissmann F. et al., 2003; Shi C., Pamer E.G., 2011]. При этом нет строгого соответствия между Ly6C+ и M1- макрофагами, а также между Ly6C- и M2-макрофагами. В некоторых случаях показано, что Ly6C+ макрофаги могут давать начало как M1, так и M2 макрофагам [Rivollier, 2012; Bain, 2012].

В печени млекопитающих обнаружено две популяции макрофагов: резидентные макрофаги - клетки Купфера и макрофаги, производные моноцитов крови. Показано, что обе популяции участвуют в регенерации печени, но на разных стадиях репаративного процесса [Chazaud B., 2014, Zigmond E. et al., 2014]. На начальных стадиях острого поражения парацетамолом и другими гепатотоксическими веществами в печени уменьшается количество резидентных макрофагов (клеток Купфера) и увеличивается содержание макрофагов, производных моноцитов крови. Подавление инфильтрации печени такими макрофагами приводит к более выраженному повреждению органа. На более поздних стадиях воспалительного процесса в печени происходит восстановление количества клеток Купфера [You Q. et al., 2013, Zigmond E. et al., 2014]. При этом если искусственно вызвать уменьшение доли клеток Купфера в печени, особенно на ранних стадиях регенерации или перед нанесением повреждения, то произойдет усиление пролиферативного ответа гепатоцитов. Считается, что подавление регенерации печени клетками Купфера происходит за счет синтезируемого ими IL-18 [Xu C.S. et al., 2012, You Q. et al., 2013].

Отмечена также и ключевая роль макрофагов в регенерации скелетной мышечной ткани [Duffield J.S. et al., 2005]. Показано, что вскоре после повреждения мышечную ткань инфильтрируют макрофаги с фенотипом Ly6CposCCR2posCX3CR1lo, которые являются производными моноцитов

крови и, которые, видимо, могут быть отнесены к M1-макрофагам. Далее в мышце повышается количество Ly6CnegCCR2negCX3CR1hi макрофагов, относящихся к M2 типу [Arnold L. et al., 2007, Saclier M. et al., 2013]. Для регенерации скелетной мышечной ткани показана ключевая роль макрофагов в стимуляции миосаттелитов. При этом M1 макрофаги стимулируют пролиферацию миосаттелитов, а M2-макрофаги их дифференцировку и образование из них миотуб [Saclier M. et al., 2013].

Анализ последних литературных данных позволил выдвинуть предположение, что основными регуляторами раннего иммунного ответа являются МСК, способные переключать M1 (классически активированный, провоспалительный) тип макрофагов на M2 (альтернативно активированный, противовоспалительный) [Prockop D.J., 2013, Arutyunyan I. et al., 2015]. Экспериментальные исследования *in vivo* подтверждают, что трансплантация МСК оказывает непосредственное влияние на баланс M1/M2 макрофагов, при этом МСК из различных источников могут отличаться по эффективности воздействия. Так, на модели эмфиземы легких было показано, что МСК жировой ткани способны только снижать количество M1 макрофагов, а МСК костного мозга способны еще и увеличивать количество M2 макрофагов [Antunes M.A. et al., 2014]. На модели сепсиса было показано, что введение МСК снижает уровень провоспалительных цитокинов IFN γ , TNF α , IL1 β , IL6 и увеличивает уровень противовоспалительного IL-10 [Lombardo E. et al., 2015], при этом источником IL-10 являются не сами МСК, а активированные ими по M2 пути макрофаги [Németh K., 2009]. Основным медиатором M2 пути активации макрофагов считается PGE2, синтезируемый МСК. Тем более парадоксальным выглядит наблюдение, что системное введение PGE2 оказывает провоспалительное действие [Madrigal M. et al., 2014], что еще раз подтверждает, что биологическая активность МСК обусловлена более сложными механизмами.

Переключение M1/M2 путей активации макрофагов приводит к значительному изменению цитокинового профиля, затрагивающему не только иммунный ответ. Показано, что именно M2 (но не M1) макрофаги являются локальным источником HGF на ранних этапах после повреждения мышечной ткани [Sawano S. et al., 2014]. В отличие от M1 типа, M2 макрофаги синтезируют целый пул проангиогенных факторов, включая FGFb (basic fibroblast growth factor), IGF1 (insulin-like growth factor-1), Ccl2 (chemokine (C-C motif) ligand 2) and PGF (placental growth factor), при этом M2a подтип макрофагов стимулирует ангиогенез в основном FGF-опосредованным путем, а основным эффектором M2c макрофагов является PGF [Jetten N. et al., 2014]. Кроме того, показано, что M2a макрофаги на высоком уровне секретируют PDGF-BB, а M2c макрофаги – MMP9, совместно обеспечивая спрутинг эндотелиальных клеток за счет ремоделирования внеклеточного матрикса и привлечения перицитов [Spiller K.L. et al., 2014]. Оба типа макрофагов способны к синтезу основного проангиогенного фактора VEGF, однако в условиях гипоксии эту способность сохраняют только M2 макрофаги [Wu J. et al., 2010]. На модели инфаркта миокарда показано, что локальная совместная доставка FGF и HGF привлекает в область повреждения M2 макрофаги и сопровождается активным ангиогенезом, а блокирование макрофагальной инфильтрации клодронатом значительно подавляет ангиогенез. Результаты исследования позволили авторам даже ввести новый термин «проангиогенные макрофаги» (англ. “pro-angiogenic macrophages”) [Barbay V. et al., 2015].

1.4 ФАКУЛЬТАТИВНЫЕ ПУТИ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

С самого начала систематического изучения регенерации печени млекопитающих было предложено две модели данного процесса: одна, модель «текущей печени», предполагала наличие прогениторных клеток в районе порталных трактов [Kung J.W.C., Forbes S.J., 2012, Forbes S. J., Newsome Ph. N., 2012]. Эти гипотетические клетки постепенно дифференцируются как в холангиоциты, замещающие клетки в желчных путях, так и в гепатоциты, которые продвигаются от порталных трактов в направлении центральной вены и тем самым восполняют естественную убыль функционирующих клеток. Вторая модель предполагала, что при регенерации в митотический цикл вступают все клетки печени и тем самым замещается убыль тканей органа [Kung J.W.C., Forbes S.J., 2012].

В настоящее время рассматриваются обе эти модели, но для разных условий регенерации печени. При повреждении печени, когда гепатоциты и другие клетки способны пролиферировать, например, при резекции вплоть до 70%, масса печени восстанавливается в основном за счет митотического размножения гепатоцитов [Michalopoulos G.K., 2010]. Если после повреждения печени у лабораторных млекопитающих пролиферацию гепатоцитов заблокировать каким-либо способом (чаще для этих целей используют ацетиламинофлуорен), то в печени этих животных в перипортальной области печеночной долики обнаруживается множество клеток с овальным ядром [Michalopoulos G.K., 2011].

В 1956 году Farber [Farber E., 1956] для популяции этих клеток предложил термин «овальная клетка». При изучении экспрессии генов было показано, что овальные клетки занимают промежуточное положение между гепатоцитами и холангиоцитами. Кроме того, они способны, как и гепатобласты синтезировать альфафетопротеин. Было показано также, что

овальные клетки в условиях блокированной пролиферации гепатоцитов дифференцируются сначала в так называемые малые гепатоциты, которые постепенно созревают и восполняют потерю паренхиматозных клеток [Michalopoulos G.K., 2011].

При острой печеночной недостаточности у человека как вирусной, так и токсической этиологии была также обнаружена сходная популяция клеток, которые по своим свойствам занимают промежуточное положение между гепатоцитами и холангиоцитами. Для обозначения подобных клеток часто используют термин «дуктулярные гепатоциты» [Sirica A.E., Gainey T.W., Mum V.R., 1994].

Таким образом, овальные и сходные с ними по свойствам клетки участвуют в регенерации в том случае, когда размножение гепатоцитов по каким-либо причинам невозможно, поэтому их называют факультативными стволовыми клетками печени [Michalopoulos G.K., 2011].

С самого обнаружения подобных популяций клеток в печени млекопитающих обсуждается вопрос об их происхождении: печеночном или внепеченочном. Большинство авторов склоняется к тому, что чаще всего овальные клетки являются производными билиарного эпителия, в том числе эпителия канальцев Геринга [Terada T. et al., 1995, 1997]. Однако другими авторами показано, что овальные клетки могут происходить из гемопоэтических стволовых клеток красного костного мозга [Yovchev M.I., 2008].

В настоящее время концепция о резидентной прогениторной клетки печени млекопитающих продолжает разрабатываться. Одни авторы предполагают наличие отдельного типа клеток-предшественниц гепатоцитов и холангиоцитов. Возможно, такими клетками являются овальные клетки, которые располагаются в составе терминальных холангиол (канальцы Геринга). Данные клетки экспрессируют маркеры холангиоцитов: цитокератин 19, panCK и другие, а также транскрипционный фактор SOX9

[Bird T.G., et al. 2013, Furuyama K. et al. 2011, Malato Y. et al. 2011]. Близким к описанному является представление, в соответствии с которым все холангиоциты рассматриваются в качестве факультативных прогениторных клеток печени. При повреждении билиарного эпителия часть клеток претерпевает репрограммирование, в результате чего, вероятно, появляются овальные клетки [Michalopoulos G.K., 2011, Rodrigo-Torres D., et al. 2014], которые далее способны дифференцироваться как в холангиоциты, так и в гепатоциты. Следствием этих событий является сначала увеличение доли, клеток, которые экспрессируют маркеры холангиоцитов (цитокератин 19, panCK), что рассматривается как признак активации прогениторных клеток печени [Bird T.G., et al. 2013]. Далее появляются клетки, которые экспрессируют одновременно маркеры холангиоцитов (цитокератин 19, panCK) и гепатоцитов (альбумин, NHF4). При этом подчеркивается, что такие клетки должны располагаться не только в составе желчных протоков, но и за их пределами [Furuyama K. et al. 2011, Malato Y. et al. 2011]. Одним из факторов, регулирующих пролиферацию билиарного эпителия является TWEAK. Кроме того, в ряде работ указывается на способность данного цитокина активировать резидентные прогениторные клетки печени [Han S. et al., 2003, Bird T.G., et al. 2013]. В настоящее время показано, что ключевую роль в дифференцировке прогениторных клеток печени играет NOTCH-сигналинг. При его активировании прогениторные клетки дифференцируются в холангиоциты, при подавлении – в гепатоциты. Ключевую роль в процессе переключения направлений дифференцировки играет белок Numb, который синтезируется в прогениторных клетках печени и подавляет активность NOTCH-сигналинга. Показано, что Numb начинает синтезироваться в прогениторных клетках печени под влиянием Wnt3, который выделяется макрофагами печени, при фагоцитозе погибших гепатоцитов [Boulter L. et al., 2012].

Другой альтернативный путь регенерации печени предполагает, что не только холангиоциты обладают выраженной пластичностью. Гепатоциты также в определенных условиях могут дифференцироваться в холангиоциты [Yanger K. et al., 2013, Yimlamai D. et al., 2014]. Наиболее часто подобный процесс наблюдают на экспериментальных моделях токсического повреждения печени и на модели холестаза при перевязке общего желчного протока. При этом в печени появляется сначала большое количество гепатоцитов, которые экспрессируют SOX9. Далее нарастает число клеток с фенотипом, промежуточным между гепатоцитом и холангиоцитом, то есть появляются клетки, которые экспрессируют маркеры гепатоцитов, например NHF4, альбумин и маркеры холангиоцитов ЦК19 [Yanger K. et al., 2013, Yimlamai D. et al., 2014]. Предполагается, что ведущую роль в регуляции репрограммирования гепатоцитов принадлежит Notch-сигналингу, Hippo/Yap1-каскаду [Yanger K. et al., 2013, Yimlamai D. et al., 2014].

Предполагается, что активация овальных клеток происходит под влиянием тех же факторов роста, вызывающих пролиферацию гепатоцитов (HGF, EGF и др.), поскольку овальные клетки имеют соответствующие рецепторы [Jakubowski A. et al., 2008].

Таким образом, то, какой механизм регенерации печени будет задействован, зависит от тяжести и природы повреждения. Если заблокирована пролиферация гепатоцитов, в роли прогениторных клеток для гепатоцитов выступают холангиоциты или их производные. Если заблокирована способность к митозу у клеток билиарного эпителия, то наоборот, гепатоциты выступают в роли предшественников новых холангиоцитов. В последнее время появляются данные, противоречащие такому выводу. Так, показано, что при токсическом повреждении печени действительно резко увеличивается количество клеток с фенотипом холангиоцитов - так называемые дуктулярные клетки, которые, вероятнее всего, происходят из гепатоцитов. Однако дуктулярные клетки редко

дифференцируются в зрелые гепатоциты, а дают начало только билиарному эпителию. Таким образом, даже при токсическом повреждении печени новые гепатоциты образуются только из предсуществующих гепатоцитов, когда как холангиоциты могут образовываться из гепатоцитов [Yanger K. et al., 2014].

Гепатоциты в пределах печеночной долики обладают разными свойствами, что связано с особенностями кровоснабжения структурно-функциональных единиц. Так известно, что при регенерации первыми в митотический цикл вступаю перипортальные гепатоциты, позднее – перицентральные. В настоящее время некоторые авторы считают, что перипортальные гепатоциты представляют особую популяцию гепатоцитов менее дифференцированных по сравнению с гепатоцитами других отделов печеночной долики, при этом перипортальные гепатоциты экспрессируют на своей поверхности рецептор Fn14 для TWEAK [Karaca G., et al. 2014]. Таким образом, TWEAK/Fn14-сигнальный путь участвует в регуляции пролиферации гепатоцитов, а не только в стимуляции прогениторных клеток печени.

Исходя из приведенных данных, за последние несколько десятилетий интенсивного изучения регенерации были получены многочисленные данные о молекулярных и клеточных механизмах регенерации печени млекопитающих после различного рода повреждений. Однако, несмотря на это, остается нерешенным множество вопросов. Прежде всего, это касается выяснения механизмов, с помощью которых организм оценивает объем нанесенного повреждения и регулирует размер регенерирующей печени. Также по-прежнему актуальным является изучение межклеточных взаимодействий при регенерации печени. Данная проблема тесно связана с разработкой современных методов стимуляции репаративных процессов, в том числе и с использованием клеточных технологий.

1.5 РЕГЕНЕРАТИВНАЯ МЕДИЦИНА ЗАБОЛЕВАНИЙ ПЕЧЕНИ

Основной целью стимуляции репаративной регенерации печени является поддержание на нормальном уровне или восстановление числа полноценных гепатоцитов в печени. Этого можно добиться двумя способами: уменьшить гибель клеток или увеличить образование новых, что обеспечит сохранение функций печени. Методы регенеративной медицины, способные обеспечить достижение этих задач можно условно выделить в несколько групп: 1) применение рекомбинантных биологически активных веществ, прежде всего, пептидных или белковых факторов роста и дифференцировки, регулирующих клеточный цикл, апоптоз, воспаление и регенерацию; 2) трансплантация дифференцированных или недифференцированных клеток для замещения погибших; 3) репрограммирование вводимых клеток в продуцирующие те или иные активные вещества, свойственные для гепатоцитов *in situ* или перед трансплантацией с помощью генно-инженерных технологий; 4) создание биоинженерной печени.

Для проведения клеточной терапии рассматривается несколько вариантов клеточного трансплантата: гепатобласты, гепатоциты, иммортализованные клеточные линии, различные типы прогениторных клеток [Yu Y. et al., 2012, Chistiakov D.A., 2012]. Наиболее перспективными с точки зрения дальнейшего применения считаются прогениторных клеток, это, прежде всего, связано со сложностью получения аутологичных гепатоцитов в достаточном количестве от пациентов с заболеванием печени. Кроме того, зрелые гепатоциты плохо приживаются в поврежденной печени [Dalgetty D.M. et al., 2009].

К используемому клеточному продукту предъявляется ряд требований. Клетки для трансплантации должны быть легко масштабируемы до количества, которое может обеспечить клинический эффект. Считается, что для замещения 10-20% массы печени человека необходимо 10^{10} клеток. Клетки трансплантата должны быть качественно гомогенными и не нести

генетических дефектов, которые могут накапливаться при длительном культивировании [Dan Y. Y., 2012]. В случае использования гепатоцитов, полученных из прогениторных клеток, они должны быть функционально полноценными, то есть предварительно должен быть оценен уровень синтеза альбумина в них, активность P450, синтез факторов свертывания, способность метаболизировать аммоний, выделять билирубин. Все эти показатели полученных гепатоцитов должны быть сопоставимы с показателями гепатоцитами взрослого человека [Yu Y. et al., 2012].

При использовании прогениторных клеток перед введением должен производиться контроль безопасности на онкогенность. Получение клеток должно производиться в GMP условиях, с исключением животных продуктов в процессе культивирования клеток, что бы предотвратить возможность заражения реципиента зоонозами. Должен быть отработан протокол криохранения вводимых клеток, перед трансплантацией должна быть проверена жизнеспособность вводимых клеток. Особенно это важно для гепатоцитов, так как показано, что повторяющиеся циклы замораживания/оттаивания приводят к необратимому снижению их функциональной активности [Dan Y. Y., 2012].

Остается открытым вопрос о способе введения трансплантируемых клеток [Jinzheng L.I. et al., 2011]. Предлагается вводить клетки через портальную вену, селезеночную или печеночную артерию. Портальная вена катетеризируется либо напрямую через кожу под контролем аппарата УЗИ, либо достигается через пунктирование яремной вены. Печеночная артерия достигается пунктированием бедренной артерии. Главным осложнением такого введения клеток является кровотечение, особенно это опасно у пациентов с печеночной недостаточностью, у которых имеются нарушения в системе гемостаза. Кроме того, всегда есть опасность тромбоза артерии или вены, что может привести к портальной гипертензии [Dan Y. Y., 2012].

Все указанные способы введения использовали как в доклинических исследованиях, так и при трансплантации клеток людям. При этом сложно выбрать какой-либо один предпочтительный способ. При введении клеток через селезеночную артерию, как показано на лабораторных животных, доля прижившихся клеток ниже по сравнению с другими способами введения. Это объясняется неблагоприятным влиянием высокого кровяного давления в селезеночной артерии на вводимые клетки. При циррозе печени, портальная гипертензия может привести к обратному току крови и клетки, вводимые через воротную или селезеночную вену, могут так и не попасть в печень. Также рассматривается способ введения клеток в брюшную полость, что технически намного проще выше перечисленных способов, однако при таком способе процент хоминга клеток в печень низок [Kung J.W.C., Forbes S.J., 2012, Forbes S. J., Newsome Ph. N., 2012, Dan Y. Y., 2012].

1.5.1 Острая печеночная недостаточность

Острая печеночная недостаточность развивается в результате массивной гибели гепатоцитов. Исходя из этого, в организме имеется острая потребность в зрелых активно функционирующих гепатоцитах, которые чаще всего и применяют при данном виде патологии. С этих позиций введение прогениторных клеток может оказаться неэффективным, несмотря на их способность стимулировать регенерацию печени в целом [Dan Y. Y., 2012].

Многими авторами в эксперименте для лечения острой печеночной недостаточности использовались гепатоциты, при этом были получены обнадеживающие результаты [Stocum D., 2006]. Введение гепатоцитов животным с острой печеночной недостаточности приводило к снижению смертности. Однако в большинстве работ отмечается, что после трансплантации гепатоцитов наблюдается лишь временное увеличение функциональной активности печени, свидетельствующее о низкой

выживаемости трансплантируемых гепатоцитов [Allen K.J., Soriano H.E. 2001]. Предполагается, что трансплантируемые гепатоциты плохо приживаются вследствие неблагоприятного микроокружения в поврежденной печени [Friedman S.L. 2008]. Исходя из этого, возникает вопрос о месте введения данного типа клеток. В некоторых экспериментальных работах показана хорошая приживаемость гепатоцитов после введения в селезенку [Kung J.W.C., 2009].

На основании успешной трансплантации гепатоцитов лабораторным животным предпринимаются попытки введения данного типа клеток людям с острой печеночной недостаточностью. К 2006 году сообщалось о 78 трансплантации гепатоцитов людям [Fisher R.A., Strom S.C. 2006]. Источником гепатоцитов может служить печень взрослого человека или плода. Введение интраперитонеально в среднем 10^7 гепатоцитов взрослого человека в воротную вену или 10^7 фетальных гепатоцитов на 1 кг веса пациентам с фульминантным гепатитом приводило к уменьшению явлений энцефалопатии, снижению уровня аммония в крови [Habibullah C.M., 1994]. Однако улучшение носило временный характер. Неустойчивость положительного эффекта от введения гепатоцитов, как и в экспериментальных работах, объясняется, видимо, недостаточным количеством вводимых клеток, плохой их приживаемостью при введении в воротную печень или интраперитонеально. Кроме того, при введении клеток в воротную вену наблюдались такие осложнения как тромбоз данной вены, а также явления портальной гипертензии [Fisher R.A., Strom S.C. 2006].

Для повышения доли прижившихся гепатоцитов при трансплантации предложено их вводить в составе тканеинженерной конструкции на основе децеллюляризованного межклеточного матрикса печени. Показано, что рецеллюляризованный трансплантат выполняет все необходимые функции – синтезирует альбумин, мочевины, экспрессирует P450. Трансплантация подобной тканевой конструкции крысам после расширенной гепатэктомии

улучшает показатели функции печени и увеличивает выживаемость крыс [Uygun B. et al., 2010].

Существует несколько сообщений о способности МСК дифференцироваться в зрелые гепатоциты [Lee K.D. et al. 2004, Zemel R. et al., 2009]. Первые данные были получены при трансплантации МСК, выделенных из костного мозга человека, крысам с острым повреждением печени аллиловым спиртом. Сходные результаты были получены и при трансплантации МСК из жировой ткани человека мышам с острым гепатитом, вызванным CCl₄. [Seo M.J. et al., 2005] Несмотря на то, что возможность дифференцировки МСК в гепатоциты считается хорошо доказанной, механизмы терапевтического эффекта МСК при печеночной недостаточности остаются неизученными, поскольку при трансплантации МСК доля дифференцировавшихся в гепатоциты и прижившихся клеток довольно низка [Wu X.B., Tao R, 2012]. Большинство авторов в качестве ведущего механизма терапевтического воздействия МСК при остром поражении печени считает паракринный эффект, так как вводимые МСК способны синтезировать большое число цитокинов, факторов роста и тем самым стимулировать регенерацию печени [Drosos I., George K., 2013].

Другим типом прогениторных клеток, которые оказывают стимулирующее воздействие на регенерацию при острой печеночной недостаточности, являются гемопоэтически стволовые клетки. В опытах по трансплантации гемопоэтических стволовых клеток красного костного мозга показана их способность дифференцироваться в гепатоциты у животных с поврежденной печенью [Petersen B.E. et al., 1999]. Несмотря на то, что протоколы по мобилизации гемопоэтических клеток у больных с острой печеночной недостаточностью разработаны, данный способ лечения не используется [Wesson R.N., Cameron A.M., 2011].

Еще одним направлением в лечении острой недостаточности печени является применение рекомбинантных факторов роста. Показано, что при

острой печеночной недостаточности у собак введение рекомбинантного HGF стимулирует регенерацию печени и благоприятно сказывается на клинических показателях подопытных животных [Kobayashi Y. et al., 1996].

Несмотря на положительный эффект от введения МСК и других прогениторных клеток, а также рекомбинантных факторов роста при острой печеночной недостаточности терапией выбора следует признать трансплантацию гепатоцитов. Поскольку точкой приложения действия активных веществ, выделяемых МСК, а также вводимых рекомбинантных факторов роста чаще всего являются активно функционирующие гепатоциты, в которых в данном случае организм испытывает острую потребность.

1.5.2 Хроническая печеночная недостаточность

Одной из самых распространенных нозологий, сопровождающихся хронической печеночной недостаточностью является цирроз печени.

При данном виде патологии в терапевтических целях пытаются трансплантировать как гепатоциты, так и прогениторные клетки. Хроническая печеночная недостаточность является более подходящим состоянием для трансплантации прогениторных клеток, чем острая печеночная недостаточность, поскольку есть время для возможной дифференцировки прогениторных клеток в необходимые зрелые клетки [Dan Y. Y., 2012].

При доклинических исследованиях введение нативных гепатоцитов или гепатоцитов, производных стволовых/прогениторных клеток, животным с хронической печеночной недостаточностью приводило к улучшению функции печени [Kobayashi N. et al., 2000]. Кроме того, в этих работах показан небольшой процент репопуляции поврежденной печени введенными гепатоцитами [Yamamoto H. et al., 2003]. При введении гепатоцитов в селезеночную вену пациентам с циррозом печени получены сходные результаты, в данном случае показана приживаемость гепатоцитов в белой

пульпе селезенки. Однако терапевтический эффект был незначительным [Mito M. et al., 1992].

Помимо использования гепатоцитов осуществляются попытки коррекции печеночной недостаточности при циррозе с помощью МСК [Teraï S. et al., 2006]. При доклинических испытаниях показано, что МСК в условиях хронического повреждения печени, в том числе и при CCl₄-индуцированном циррозе, способны дифференцироваться в гепатоциты. При этом авторы таких работ отрицают эффект слияния введенных МСК с гепатоцитами печени [Ogawa S., Miyagawa S., 2009, Wu X.B., Tao R, 2012]. Показано, что помимо заместительного эффекта, МСК стимулируют регенерацию паренхимы печени, а также деградацию фиброзного матрикса. Уменьшение фиброзирования в печени также отмечалось при трансплантировании макрофагов животным с индуцированным циррозом [Forbes S.J., Newsome P.N., 2011].

Клинические испытания (I и II фазы) показали, что введение аутологичных МСК костного мозга через портальную вену или периферический кровоток значительно улучшают состояния пациентов с циррозом печени [Chistiakov D.A., 2012]. Внутривенное введение МСК из красного костного мозга пациентам с циррозом печени приводило к улучшению функции печени, увеличение активности ММР-9, повышение митотической активности гепатоцитов [Teraï S. et al., 2006]. Введение аутологичных МСК в портальную вену больных циррозом печени приводило к улучшению их клинического состояния, повышению уровня альбумина в крови, нормализации уровня билирубина и креатинина [Lyga A.C. et al., 2007]. Сходные результаты были получены и при использовании прогениторных клеток, выделенных из периферической крови. Однако неясно, за счет чего достигался терапевтический эффект: за счет трансдифференцировки МСК в гепатоциты, ремоделирования соединительной ткани в пораженной печени или за счет стимуляции

регенерации факторами роста, выделяемыми МСК [Forbes S.J., Newsome P.N., 2011].

Несмотря на сообщения о положительном эффекте от введения МСК лабораторным животным и пациентам с циррозом печени, получены данные о способности МСК стимулировать развития цирроза. Показано, что МСК, попавшие в печень, сохраняли фибробластоподобный фенотип и обнаруживались среди волокон коллагена, У них также отсутствовала экспрессия маркеров гепатоцитов [Russo F.P. et. al, 2006, Baertschiger R.M., 2009].

Большинство клинических испытаний показали благоприятный эффект применения гемапозитических стволовых клеток при циррозе печени. Введение в кровь CD 34+ приводило к длительному (до 1 года) улучшению функций печени. Однако, как и в случае МСК, на лабораторных животных установлена способность гемапозитических стволовых клеток дифференцироваться в миофибробластоподобные клетки и стимулировать цирроз [Kung J.W.C., Forbes S.J., 2009, Chistiakov D.A., 2012].

В настоящее время разрабатываются подходы для лечения цирроза печени методами генной терапии. Показано, что TGF β является профибротическим цитокином, кроме того является антипролиферативным и проапоптотическим фактором роста. Таким образом, блокирование TGF β или его сигнального пути может привести к улучшению состояния поврежденной печени [Prieto J. et al., 2004]. Показано, что введение аденовирусного вектора, кодирующего доминант-негативный рецептор II типа TGF β приводит к уменьшению цирроза у подопытных мышей. Известно, что Smad 7 является внутриклеточным антагонистом TGF β , введение аденовирусного вектора с геном Smad 7 приводило к уменьшению цирроза в печени у животных. Введение животным с циррозом плазмиды с геном HGF приводило к уменьшению фиброза в печени и уровня апоптоза гепатоцитов, а также увеличивало выживаемость таких животных [Matsuno Y. et al., 2003].

Введение аденовирусного вектора с геном MMP-1 приводило к уменьшению фиброза в печени, сходные результаты были получены при введении аденовирусного вектора с активатором плазминогена, что приводило к активации синтеза коллагеназы [Salgado S. et al., 2000]. Проблематичность в применении генной терапии для лечения цирроза печени заключается в сложности трансдуцирования клеток цирротической печени, кроме того вводимый вектор может привести к утяжелению клинического состояния пациента.

Другим возможным подходом лечения цирроза является назначения рекомбинантных белков. Введение рекомбинантного BMP-7 крысам вызывает уменьшению доли соединительной ткани в поврежденной печени, предположительным механизмом является уменьшению синтеза коллагена – I звездчатыми клетками и снижению экспрессии в них TGFβ1 [Zhong L. et al., 2013].

К настоящему времени в области регенеративной медицины цирроза печени достигнуты определенные успехи. Во многих работах показан положительный эффект от введения прогениторных клеток того или иного типа, однако по-прежнему неизвестны точные механизмы их действия. Большинство авторов склоняется к паракринной теории влияния прогениторных клеток. Помимо положительного эффекта от введения прогениторных клеток, описаны случаи, когда вводимые клетки усиливали цирротическое повреждение печени. Таким образом, требуются дальнейшие работы по выяснению механизмов терапевтической активности стволовых и прогениторных клеток.

Основной проблемой генной терапии тех или иных заболеваний печени является разработка оптимальных путей доставки целевого гена в клетки печени. Имеющиеся в настоящее время в распоряжении исследователей векторы могут приводить к тем или иным осложнениям. Кроме того, уровень трансдукции часто остается недостаточно высоким.

1.5.3. Опухоли печени

Хирургическое лечение первичных и вторичных опухолей печени часто предполагает резекцию органа довольно большого объема. После таких операций смертность пациентов в результате острой печеночной недостаточности крайне высока. Сходная клиническая картина наблюдается и при трансплантации печени, когда пересаживаемый участок оказывается слишком мал для поддержания нормального уровня обмена веществ [Dan Y.Y. 2012]. Учитывая способность прогениторных клеток стимулировать регенерацию печени, были предприняты попытки борьбы с этим осложнением с помощью введения прогениторных клеток красного костного мозга. Так показан положительный эффект от трансплантации пациентам с раком печени аутологичных CD133+ стволовых клеток костного мозга через воротную вену перед эмболизацией последней. Далее проводилась резекция опухоли печени [am Esch J.S. II et al., 2005]. Помимо стимулирующего влияния на восстановительные процессы в печени, показано что аутологичные гемопоэтические клетки при введении пациентам с солидной опухолью вызывают эффект трансплантат против опухоли [Conrad R. et al., 2008].

Помимо клеточной терапии в случаях онкологических заболеваний печени возможно применение и генной терапии.

Имеется несколько подходов:

1. Доставка в опухолевый узел антиопухолевых генов
2. Доставка к опухоли или в близлежащие ткани иммуностимулирующих или антиангиогенных молекул
3. Использование генов, приводящих к гибели клеток
4. Усиление противоопухолевого иммунитета дендритными клетками или лимфоцитами.

Доставка к опухоли печени у лабораторных животных аденовирусного вектора с p53 приводило к угнетению роста опухоли [Anderson S.C. et al.,

1998]. Клиническое исследование безопасности введения ДНК, кодирующего p53, показало безопасность такого способа введения. Несмотря на то, что конечная точка не была достигнута, была зафиксирована ремиссия. Сложность применения такого подхода в лечении опухоли заключается в том, что должны быть трансдуцированы все клетки опухоли для достижения положительного результата. Для этих целей предлагается несколько подходов: разработка векторов, которые будут связываться со специфическими молекулами на поверхности опухолевых клеток, разработка векторов, которые избирательно реплицируются в опухолевых клетках, разработка систем, позволяющих целевым белкам проникать в соседние опухолевые клетки [Habib N.A. et al., 1998].

Активация предшественников терапевтических средств с помощью генов. Смысл данного подхода заключается в том, что некоторые лекарственные средства под действием ферментов могут превращаться в опухолетоксичные вещества. Так известно, что противовирусный препарат ганцикловир под действием продукта трансляции гена *tk* может превращаться в вещество, ингибирующее синтез ДНК в ядре и митохондриях. Таким образом, необходимо трансдуцировать клетки опухоли геном *tk*. Применение данной системы у лабораторных животных с гепатоцеллюлярной карциномой дало положительный результат. Клиническое испытание показало безопасность введения аденовирусного вектора с *tk* в метастатическую опухоль печени [Sung M.W. et al., 2001].

Один из разработанных подходов антиангиогенная терапия заключается во введении в опухоль клеток, экспрессирующие вещества, которые блокируют VEGF. Этот метод, был опробован на мышах с опухолью печени. Было показано, что данная процедура увеличивает выживаемость подопытных животных. Другой подход подразумевает доставку в опухоль печени векторов, несущих гены антиангиогенных веществ, например ангиостатин [Prieto J, et al., 2004, Yan F. et al., 2013].

1.5.4 Метаболические нарушения печени

Многие врожденные нарушения обмена веществ, связанные с печенью, могут быть скорректированы органной трансплантацией. Поскольку гепатоциты продуцируют белки в избыточном количестве, то предполагается, что введение небольшого числа нормальных гепатоцитов способно улучшить показатели метаболизма печени [Dan Y.Y. 2012]. На животных моделях синдрома Криглера-Наяра, тирозинемии и семейной гиперлипидемии было показано, что введение зрелых гепатоцитов приводит к улучшению показателей печеночного метаболизма [Demetriou A.A. et al., 1986, Overturf K. et al., 1997, Eguchi S. et al., 1996].

К настоящему времени около 20 пациентам с теми или иными нарушениями метаболизма печени вводились гепатоциты. Наиболее хорошо охарактеризован один из случаев синдрома Криглера-Наяра [Yu Y. et al., 2012]. Пациенту через воротную вену было трансплантировано 109 гепатоцитов, после чего у него в крови снизился уровень свободного билирубина, что позволило временно прекратить фототерапию. Однако, через 6 месяцев, уровень свободного билирубина вернулся к исходному показателю. Сходные результаты были получены у пациентов с дефицитом орнитинтранскарбамилазы и семейной гиперлипидемией [Strom S.C. et al., 1997]. По какой причине положительный эффект не был пролонгирован на более длительный срок остается неизвестным [Grossman M. et al., 1996].

Другим направлением регенеративной медицины метаболических заболеваний является генная терапия, целями которой являются увеличение экспрессии целевого гена, подавление активности того или иного гена, введение гена, продукты экспрессии которого не синтезируются в печени, репарация поврежденного гена [Dhawan A. et al., 2010]. В настоящее время применяют 5 классов векторов для введения целевого гена в клетки печени [Kren B.T. et al., 2002, Atta H.M., 2010]. Те или иные векторы обладают своими

достоинствами и недостатками. Основными осложнениями использования тех или иных векторов является инсерционный мутагенез, гепатотоксичность, онкологические осложнения.

Невирусные векторы обладают рядом преимуществ, включая минимальную токсичность, длительная экспрессия целевого гена, отсутствие гуморального ответа со стороны организма. Наибольший интерес представляет гидродинамическая техника инъекции свободных плазмид, опробованная на мышах, при этом процент трансдукции среди гепатоцитов достигает 10-15% [Atta H.M., 2010].

Экспериментальная генная терапия применялась для коррекции некоторых состояний.

Синдром Криглера-Наяра I типа, характеризуется повышением концентрации неконъюгированного билирубина в крови негемолитической природы в следствии мутации в гене, кодирующем билирубин-уридиндифосфоглюкоронат глюкоронозил трансферазы (UGT1A1). Синдром Криглера-Наяра рассматривается, как модельное нарушение метаболизма для разработки общих принципов генной терапии, поскольку хорошо изучены молекулярно-генетические механизмы его развития, существует адекватная модель на крысах, повторяющая заболевание у человека (крысы Gunn). Эффективность применяемой терапии легко оценивается с помощью измерения концентрации несвязанного билирубина в кров [Brunetti-Pierri N., 2008].

Для лечения данного синдрома использовались все те типы векторов, перечисленные выше. Ретровирус, экспрессирующий UGT1A1, вводился либо новорожденным, либо после частичной гепатэктомии крысам Gunn, чем достигалась длительная коррекция. При использовании лентивирусного вектора у крыс Gunn достигалась коррекция уровня билирубина на уровне близком к норме в течение года [Bellodi-Privato M., et al., 2005]. Подобные результаты были получены и при использовании аденовирусного вектора с

незначительными явлениями токсичности. Среди аденоаассоциированных векторов было обнаружено, что серотип 1 является более эффективным для коррекции гипербилирубинемии [Tada K. et al., 1998].

Кроме того, имеются сообщения о попытках применения методов генной терапии при других метаболических нарушениях, таких как нарушения цикла синтеза мочевины, при наследственной тирозинемии I типа [Grompe M. et al., 1998], фенилкетонурии [Bellodi-Privato M., et al., 2005]. Как и в случае с синдромом Криглера-Наяра I типа положительный эффект от применяемой терапии носил временный характер.

Основываясь на вышеизложенных фактах, можно заключить, что с помощью тех или иных методов удастся скорректировать обмен веществ при указанных нарушениях лишь на короткий срок. Дальнейшая работа должна быть направлена на преодоление недостатков существующих методов и создание новых способов лечения метаболических нарушений печени, позволяющих достигнуть стойкой ремиссии.

1.5.5 Искусственная печень

Часто в клинике имеется потребность в искусственной печени. Особенно это актуально для пациентов, ожидающих трансплантацию печени [Chistiakov D.A., 2012].

Существует 2 вида приборов, служащих этим целям: искусственная печень, которая не содержит живых компонентов и работающая за счет физических, химических градиентов, абсорбции. Для этих целей такие аппараты содержат различные виды полупроницаемых мембран, а также сорбенты в виде колонок или суспензий. В качестве сорбирующих материалов чаще всего используют уголь, ионообменные смолы, которые избирательно удаляют токсины из плазмы. В настоящее время предложено несколько таких устройств для печеночного диализа [Carpentier B., Gautier A., Legallais C., 2013]. Подобные устройства применяют по 6-8 часов в день,

до улучшения показателей обмена и исчезновения симптомов энцефалопатии. Проведено несколько клинических испытаний таких аппаратов, в ходе которых был выявлен положительный эффект от их применения. Среди осложнений применения таких аппаратов указывают риск кровотечения и внутрисосудистого свертывания крови.

Другой тип аппаратов содержит биореактор с тем или иным типом клеток, способных выполнять метаболические функции, обезвреживать токсические вещества, синтезировать необходимые белки, тем самым замещая поврежденную печень [Carpentier B., Gautier A., Legallais C., 2013]. Функциональным компонентом в такой конструкции искусственной печени наиболее часто выступают гепатоциты [Dan Y.Y., 2012].

Первые попытки создания искусственной печени показали, что используемые гепатоциты быстро теряют свои функциональные качества, а также жизнеспособность [Dalgetty D.M. et al., 2009]. В настоящее время для поддержания жизнеспособности и высокой функциональной активности применяются различные носители для гепатоцитов, наиболее распространенными являются: плоские мембраны, полые волокна [Erro E. et al., 2013].

При использовании плоских мембран удастся контролировать перфузию, концентрацию кислорода, градиент гормонов для всех гепатоцитов на стабильном уровне. При использовании таких систем наблюдается зональная дифференцировка гепатоцитов, как и *in vivo*.

Большинство опробованных в клинике аппаратов искусственной печени используют полые волокна, у которых внутри располагаются гепатоциты человека или свиньи [Diekmann S. et al., 2006, Carpentier B., Gautier A., Legallais C., 2013]. Кассеты с такими волокнами имеют большую площадь поверхности для удаления продуктов обмена из плазмы пациента. Стенка полых волокон служит как полунепроницаемая мембрана, отграничивающая клетки от плазмы, кроме того через эту мембрану

происходит поступление кислорода к гепатоцитам [Yu Y. et al., 2012]. Несмотря на это часть гепатоцитов все же может испытывать гипоксию, что приводит к снижению их функциональности и гибели. Для предотвращения этого предлагается поместить гепатоциты в микрокапсулы, содержащие гидрофильный гель, например альгинатный. Внутри такого геля, гепатоциты получают достаточно количество питательных веществ и кислорода [David B. et al., 2004].

В настоящее время разработано несколько моделей искусственной печени, все они находятся в I фазе клинических испытаний. При использовании таких систем был достигнут положительный клинический эффект, но не было получено увеличения выживаемости пациентов или снижения потребности в трансплантации [Carpentier B., Gautier A., Legallais C., 2013, Chistiakov D.A., 2012].

Довольно часто для аутологичной трансплантации трудно получить достаточно большое количество гепатоцитов человека с высокой функциональной активностью, что связано с низким содержанием нормальных гепатоцитов в поврежденной печени, а также со сложностью культивирования данного типа клеток [Dan Y.Y. 2012]. То же самое можно сказать и про аллогенные гепатоциты. В качестве практически неограниченного источника гепатоцитов с высокой функциональной активностью было предложено использовать печень свиньи, а для решения проблем с культивированием и наращиванием необходимого числа клеток были предложены различные типы клеток с высоким пролиферативным потенциалом: клетки гепатобластомы, гепатоциты дифференцированные из эпибласта свиней, обратимо иммортализованные фетальные гепатоциты [Sharma R. et al., 2010]. Применение таких клеток ограничено аппаратами искусственной печени, в связи с высокой вероятностью побочных эффектов. В случае использования гепатоцитов свиней это иммунологические реакции на чужеродные белки, кроме того, не исключена вероятность инфекции

эндогенными ретровирусами свиньи организма пациента. Подобные нежелательные эффекты нельзя полностью исключить и при использовании ксеногенных клеток в аппаратах искусственной печени [Yu Y. et al., 2012].

К настоящему времени в клинике применялся аппарат искусственной печени на основе С3А линии клеток гепатобластомы, при этом не было выявлено трансмиссии этих клеток из аппарата к пациенту [Ellis A.J. et al., 1996]. Однако было обнаружено, что у этой клеточной линии снижен уровень детоксикации аммония, активность Р450 по сравнению с гепатоцитами взрослого человека. Для повышения детоксицирующей функции клетки линии С3А были трансфецированы геном глутаминсинтетазы [Enosawa S. et al., 2001].

Чтобы избежать ограничений в использовании аппарата искусственной печени на основе клеточных линий гепатобластомы, были получены иммортализованные гепатоциты на основе фетальных гепатоцитов человека - HepCL. В эксперименте показано, что HepCL обладают высокой метаболической активностью и их трансплантация предотвращает гибель мышей с острой печеночной недостаточностью, кроме того, HepCL не обладают туморогенной активностью [Carpentier B., Gautier A., Legallais C., 2013, Chistiakov D.A., 2012].

Основной проблемой всех сконструированных к настоящему времени аппаратов биоинженерной печени является поддержание жизнеспособности и высокой функциональной активности используемых клеток. Одной из главных причин гибели клеток в таких аппаратах является гипоксия. Наиболее перспективным направлением в решении этой проблемы является создание системы микроциркуляции внутри агрегатов используемых клеток. С этой проблемой тесно соприкасается и проблема включения в аппараты искусственной печени не только гепатоцитов, но и непаренхимных клеток, регулирующих активность гепатоцитов.

В настоящее время регенеративная медицина располагает богатым спектром всевозможных методов лечения тех или иных заболеваний печени. Одним из наиболее перспективных направлений являются методы клеточной терапии. Наряду с трансплантацией гепатоцитов предлагается применять различные прогениторные клетки. При этом используют для введения как сами прогениторные клетки, так и полученные из них гепатоциты. Каждый из типов прогениторных клеток обладает достоинствами и недостатками. Наиболее перспективными в плане дальнейшего использования в клинике являются iPS и МСК, поскольку их получение не связано с этическими проблемами. Кроме того, у МСК практически отсутствует онкогенный эффект [Chistiakov D.A., 2012].

Подводя итог, можно заключить, что многие направления в регенеративной медицине печени находятся только на начальном этапе развития, и перед исследователями стоит ряд нерешенных проблем. Какие из направлений исследований будут наиболее перспективными, покажет время. Однако, на наш взгляд, основные усилия специалистов должны быть сосредоточены на создании биоинженерной печени.

Заключение

Исходя из приведенных данных, за последние несколько десятилетий регенерация печени млекопитающих изучалась очень интенсивно, в основном на модели 70% резекции.

Однако в последнее время в связи с бурным развитием хирургической техники в клинике стали применяться обширные резекции печени, а также трансплантация сегментов и долей печени. Данные вмешательства часто приводят к тяжелым осложнениям в послеоперационном периоде, в том числе к синдрому малого остатка органа, когда печень оказывается настолько маленькой, что неспособна поддерживать гомеостаз в организме. Появление таких клинических осложнений потребовало тщательных экспериментальных исследований проблемы регенерации печени после нанесения критических травм.

Несмотря на интенсивное изучение, регенерация печени после 70% резекции не может рассматриваться как модель критической травмы и синдрома малого остатка, так в после такой операции смертность подопытных животных практически отсутствует и регенерация в подавляющем числе случаев завершается. Моделью критической травмы печени может служить субтотальная резекция печени у крыс, поскольку после такой операции наблюдается высокая смертность среди лабораторных животных. Однако регенерации печени после субтотальной резекции практически неизучена.

Исходя из литературного обзора, наиболее важными направлениями изучения регенерации печени после субтотальной резекции являются изучение особенностей пролиферации гепатоцитов, молекулярных механизмов, регулирующих митотическое размножение гепатоцитов, вклад различных популяций макрофагов в регенерацию печени.

Нанесение критической травмы может изменить характер восстановительного процесса. Субтотальная резекция вызывает временный

блок митотического цикла гепатоцитов, что может привести к активации альтернативных путей регенерации печени — трансдифференцировка холангиоцитов, гепатоцитов, активация прогениторных клеток печени. Данная проблема осталась неизученной при регенерации печени после субтотальной резекции.

Регенерация печени после нанесения критического повреждения часто не завершается, что, видимо, связано с истощением репаративного потенциала органа. Таким образом, важной проблемой становится поиск способов стимуляции регенерации печени после нанесения критического дефекта. Поскольку собственных механизмов регенерации в печени может быть недостаточно, то стоит сосредоточить внимание на внепеченочных путях стимуляции репаративной регенерации. Основное внимание стоит уделить другим органам функциональной системы выделения — почкам и легким, а также стромальным клеткам-предшественницам, которые мигрируют в печень при ее повреждении из разных органов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Экспериментальная модель

Работа выполнена на 196 самцах крыс аутбредного стока Вистар массой тела 250-280 г, полученных из питомника Филиал ИБХ РАН (г. Пущино). Содержание животных и эксперименты выполнены в соответствии с приказом Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977 г. и Европейской Конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в других научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г.). На проведение исследования получено разрешение биоэтического комитета ФГБНУ «НИИМЧ», протокол № 16 от 19.11.2015 г.

У крыс, наркотизированных диэтиловым эфиром, проводили субтотальную резекцию печени. Для этого накладывали лигатуру на основание срединной, левой боковой и правой верхней доли печени, после чего их удаляли (всего 80% общей массы печени). Операцию проводили в период с 9.00 до 11.00 утра.

Животных выводили из эксперимента передозировкой диэтилового эфира через 30 мин, 3, 6, 12, 24, 30, 48, 72ч, а также через 5, 7 и 10 суток после резекции печени, по 5-6 животных на каждый срок. При этом в качестве контроля использовали ложнооперированных крыс по 5 животных на каждый срок и интактных крыс ($n=10$), одного возраста с оперированными животными. Ложнооперированным животные под эфирным наркозом проводили лапоротомию, вскрывали брюшную полость. Срединную, левую боковую и верхнюю правую доли печени осторожно выводили в рану на короткое время, а затем помещали в брюшную полость, стенку которой ушивали. Ложнооперированных крыс выводили из опыта в те же сроки, что и экспериментальных.

Показателем полноты регенерации печени служило восстановление массы печени, которую оценивали с помощью взвешивания извлеченного органа перед фиксацией.

2.2 Трансплантация МСК

Перед введением для изучения миграции и дифференцировки МСК окрашивали мембранным трейсером РКН26. Введение клеток производили сразу после выполнения субтотальной резекции. Животным опытной группы клеточную суспензию (1 млн МСК в 1 мл 0,9% водного раствора NaCl) вводили в селезенку инъекционно по 100мкл×10. В качестве группы сравнения использовали животных, которым в селезенку вводили 1 мл 0,9% водного раствора NaCl. Животных выводили из эксперимента передозировкой диэтилового эфира в период с 9.00 до 11.00 через 3, 6, 24, 48ч, 3, 7 или 10 суток после трансплантации

Определяли отношение массы печени к массе тела крысы. В качестве группы сравнения использовали животных, которым вместо суспензии МСК пупочного канатика в селезенку вводили 1 мл 0,9% раствора NaCl.

2.3 Оценка функции печени

Для оценки восстановления функций печени в сыворотке крови подопытных крыс определяли концентрацию альбумина и активность АЛТ. Концентрацию альбумина определяли с помощью фотометрического теста с бромкрезоловым зеленым (Albumin DiaS, Диакон-ДС, Россия), активность АЛТ определяли фотометрическим тестом (ALAT(GPT Dias) Диакон-ДС, Россия).

2.4 Гистологическое исследование

Для гистологического исследования печень фиксировали в 10% забуференном растворе формалина, после стандартной проводки

заливали в парафин, далее готовили срезы толщиной 5-7 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином.

2.5 Митотическая активность

Определяли митотический индекс гепатоцитов или макрофагов, выраженный в промилле (‰). Митозы подсчитывали на гистологических срезах печени, окрашенных гематоксилином и эозином на 6000 клеток для каждого животного.

2.6 Иммуногистохимическое исследование

Иммуногистохимическое исследование проводилось с использованием иммунопероксидазного и иммунофлуоресцентного метода. В таблице 1 представлен перечень всех использованных антител.

При применении иммунопероксидазного метода проводили депарафинизацию гистологических срезов, далее демаскировку антигена путем кипячения срезов в цитратном буфере (pH 6,0). Применяли соответствующие вторые антитела и систему визуализации (Abcam, Великобритания). Срезы докрашивали гематоксилином.

При применении иммунофлуоресцентного метода использовали криосрезы. После инкубации с первыми антителами использовали соответствующие вторые антитела, конъюгированные с флуоресцентной меткой.

На препаратах подсчитывали клетки, окрашенные с помощью соответствующих антител, затем вычисляли соответствующий индекс как отношение окрашенных клеток к общему числу клеток в процентах (%).

Таблица 1. Список использованных антител

	Первые антитела	Назначение
1.	Ki-67	маркер пролиферации
2.	CD68	общий маркер макрофагов
3.	CD31	маркер эндотелиоцитов
4.	FAPalpha	маркер активных фибробластов
5.	CK19	маркер холангиоцитов
6.	CK18	маркер гепатоцитов
7.	alphaSMA	маркер гладких миоцитов
8.	SOX9	маркер малодифференцированных клеток
9.	CD206	маркер M2a, M2c макрофагов
10.	TGF β	антитела к трансформирующему фактору роста β
11.	betaTubulin	антитела к β -тубулину
12.	CX3CR1	маркер макрофагов костномозгового происхождения
13.	TWEAKR (Fn14)	антитела к рецептору цитокина TWEAK
14.	TNFα	антитела к фактору некроза опухолей α
15.	Caspase3	антитела к каспазе 3- маркер апоптоза
Вторые антитела и система визуализации		
1.	goat to rabbit	FITC
2.	rabbit specific HRP/DAB kit	HRP/DAB
3.	mouse specific HRP/DAB kit	HRP/DAB

2.6 Вестерн-блот анализ

Количество белка в регенерирующей печени определяли методом вестерн-блот гибридизации. Выделение общего белка из образцов печени крыс проводили с помощью набора MicroRotoforCellLysiskit (Bio-Rad Laboratories, Inc., США). Концентрацию общего белка измеряли по методу Брэдфорда, используя набор QuickStartBovine γ -GlobulinStandardSet (Bio-Rad Laboratories, Inc., США). Перенос белков из геля на PVDF мембрану осуществляли полусухим способом при помощи набора Trans-Blot® Turbo™ RTA Mini LF PVDF TransferKit (Bio-Rad Laboratories, Inc., США). Далее мембраны окрашивали первыми антителами к соответствующему белку в разведении 1:100 или антителами к β -тубулину, который служил референсным белком (1:100, Abcam, Великобритания). Далее вторыми антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена Immun-StarGoatAnti-Rabbit (GAR)-HRP Conjugate (Bio-Rad Laboratories, Inc., США). Проявление блота проводили с помощью набора Clarity™ Western ECL (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) и системы визуализации ChemiDoc™ (Bio-Rad Laboratories, Inc., США). Анализ полученных результатов проводили в программе ImageLab (Bio-Rad Laboratories, Inc., США).

2.7 ИФА-анализ

Количественный анализ содержания белка HGF в образцах проводили с помощью набора для иммуноферментного анализа (Cloud-Clone Corp., SEA047Ra, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Экстракцию белков из замороженных образцов печени проводили при помощи набора MicroRotofor Cell Lysis Kit (Bio-Rad, США). Нормирование данных

вели по концентрации общего белка, определенную методом Бредфорд набором Quick Start™ Bradford Protein Assay Kit (Bio-Rad, США). Измерение оптической плотности ($\lambda=450$ нм) проводили с помощью спектрофотометра Multiskan GO (ThermoFisher Scientific, США). Анализ данных проводили с помощью онлайн-приложения <http://elisaanalysis.com/app>.

2.8 Оценка клеточной гибели

Оценку клеточной гибели в ходе регенерации печени осуществляли с помощью метода TUNEL. Для этих целей использовали набор Apo-BrdU *In Situ* DNA Fragmentation Assay Kit (BioVision, США). Исследование проводили в соответствии с руководством фирмы-производителя. На последнем этапе ядра клеток докрашивали пропидиум-йодидом (PI).

2.9 Полимеразная цепная реакция в реальном времени

Одним из ведущих клеточных механизмов регенерации печени млекопитающих является пролиферация гепатоцитов. Вступление гепатоцитов в митотический цикл регулируется рядом цитокинов, а прохождение гепатоцитами стадий митотического цикла - факторами роста. С целью характеристики молекулярных механизмов пролиферации гепатоцитов после субтотальной резекции печени изучалась экспрессия генов провоспалительных цитокинов *il1 β* , *il6*, *tnfa* и противовоспалительного - *il10*, а также экспрессию генов фактора роста гепатоцитов - *hgf*, фактора роста фибробластов 2 - *fgf2*, трансформирующего фактора роста β - *tgf β* . Ремоделирование межклеточного матрикса оценивали по экспрессии гена металлопротеиназы 9 - *mmp9*. Молекулярные механизмы миграции

стромальных клеток, предшественников эндотелиоцитов и лимфоцитов в печень исследовались с помощью экспрессии гена *sdf1α* (stromal cell-derived factor 1α), неоваскулогенеза - гена эндотелиального фактором роста (*vegф*) и ангиогенина (*ang*).

Маркером активности системы макрофагов служила экспрессия гена индуцируемой NO-синтетазы (*iNOs*), которая также отражает процесс неоваскулогенеза [Wermuth P.J., Jimenez S.A., 2015].

Масса печени после субтотальной резекции может восстанавливаться не только за счет пролиферации гепатоцитов, но также и за счет активации прогениторных клеток печени с последующей их дифференцировкой в направлении гепатоцитов, кроме того может наблюдаться процесс трансдифференцировки гепатоцитов в направлении холангиоцитов. Эти процессы регулируются NOTCH- и TWEAK-сигнальными путями. Активность NOTCH- сигнального пути была охарактеризована по экспрессии генов его рецепторов *notch1*, *notch2*, а также зависящих от них факторов транскрипции *sox9*, *hes1*, *yap1*. Активность TWEAK - сигнального пути - по экспрессии генов его рецептора - *fn14*, а также гена самого *tweak*.

Изучаемые гены можно разделить на несколько групп в зависимости от их функции (Таблица 2) Экспрессию изучаемых генов определяли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). При выведении животных из эксперимента кусочки печени, легких и почек массой 30 мг помещали в РНК-лейтер (QIAGEN), инкубировали в течение суток при +4°, хранили при -80°. В качестве индивидуального контроля использовали ткань удаленных долей печени. В случае легких и почек контролем служили органы интактных животных. Из полученных образцов выделяли тотальную РНК помощью набора RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN). Синтез кДНК с матрицы полученной тотальной РНК осуществляли с использованием готового набора реактивов MMLV

RT kit (Евроген, Россия). С полученными кДНК ставили ПЦР с помощью готовых наборов реактивов qPCRmix-HS SYBR, содержащие флуоресцентный интеркалирующий краситель Sybr Green I (Евроген, Россия). Праймеры для ПЦР подбирали с помощью on-line программы Primer-BLAST в соответствии с общепринятыми требованиями. Выбранные праймеры (Таблица 2) синтезированы фирмой Евроген (Россия).

Таблица 2. Используемые праймеры

target symbol	direction	sequence (5' to 3')	NCBI Ref Seq	target definition
<i>ang</i>	forward	GCGAATGGAAGCCCTTACG	NM_001012359.1	<i>Rattus norvegicus</i> angiogenin, ribonuclease A family, member 2 (Ang2), mRNA
	reverse	GCCTGCTGAGTAGAGACTGAT		
<i>fgf2</i>	forward	CCAAGCGGCTCTACTGCAA	NM_019305.2	<i>R. norvegicus</i> fibroblast growth factor 2 (Fgf2), mRNA
	reverse	AGCCGTCCATCTTCCTTCATAG		
<i>fn14</i>	forward	GGA CTG CGC TTC TTG TCC A	NM_181086.3	<i>R. norvegicus</i> tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a (Tnfrsf12a), mRNA
	reverse	GCA GCC TTC TCC ACC AGT CT		
<i>hgf</i>	forward	GGCCATGGTGCTACACTCTT	NM_017017.2	<i>R. norvegicus</i> hepatocyte growth factor (Hgf), mRNA
	reverse	TTGTGGGGGTACTGCGAATC		
<i>il10</i>	forward	GCC CAG AAA TCA AGG AGC AT	NM_012854.2	<i>R. norvegicus</i> interleukin 10 (Il10), mRNA
	reverse	TGA GTG TCA CGT AGG CTT CTA		
<i>il1b</i>	forward	CTG TCT GAC CCA TGT GAG CT	NM_031512.2	<i>R. norvegicus</i> interleukin 1 beta (Il1b), mRNA
	reverse	ACT CCA CTT TGG TCT TGA CTT		
<i>il6</i>	forward	TAC ATA TGT TCT CAG GGA GAT	NM_012589.2	<i>R. norvegicus</i> interleukin 6 (Il6), mRNA
	reverse	GGT AGA AAC GGA ACT CCA G		

<i>iNOs</i>	forward	CGC TGG TTT GAA ACT TCT CAG	NM_012611.3	<i>R. norvegicus</i> nitric oxide synthase 2, inducible (Nos2), mRNA
	reverse	GGC AAG CCA TGT CTG TGA C		
<i>mmp9</i>	forward	ATGGTTTCTGCCCCAGTGAG	NM_031055.1	<i>R. norvegicus</i> matrix metalloproteinase 9 (Mmp9), mRNA
	reverse	CACCAGCGATAACCATCCGA		
<i>sdfa</i>	forward	TGCCGATTCTTTGAGAGCCA	NM_022177.3	<i>R. norvegicus</i> chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (Cxcl12), transcript variant 1, mRNA
	reverse	TCCTTTGGGCTGTTGTGCTT		
<i>sox9</i>	forward	AGA GGC CAC CGA ACA GAC T	XM_003750950.3	<i>R. norvegicus</i> PREDICTED: SRY (sex determining region Y)-box 9 (Sox9), mRNA
	reverse	TGC TCA GCT CAC CGA TGT C		
<i>tgfb</i>	forward	CCGCAACAACGCAATCTATG	NM_021578.2	<i>R. norvegicus</i> transforming growth factor, beta 1 (Tgfb1), mRNA
	reverse	AGCCCTGTATTCCGTCTCCTT		
<i>tnfa</i>	forward	CCA CCA CGC TCT TCT GTC TA	NM_012675.3	<i>R. norvegicus</i> tumor necrosis factor (Tnf), mRNA
	reverse	GCT ACG GGC TTG TCA CTC G		
<i>tweak</i>	forward	GAT GGA GCA CAG GCA GGT G	NM_001001513.2	<i>R. norvegicus</i> tumor necrosis factor ligand superfamily member 12 (Tnfsf12), mRNA
	reverse	TGG CTG AGA ATT CTT CCA G		
<i>yap1</i>	forward	CTT CGC AAG CTG CCC GAC T	NM_001034002.2	<i>R. norvegicus</i> yes-associated protein 1 (Yap1), mRNA
	reverse	GGG ATC TCA AAG GAA GAC TG		
<i>notch1</i>	forward	AGT GGC CAA CGG CAC TGA A	NM_001105721.1	<i>Rattus norvegicus</i> notch 1 (Notch1), mRNA
	reverse	CAT TGG CCA GAG GTG TCA GG		

<i>notch2</i>	forward	CCA CAA CGG CAC AGG CTA C	NM_024358.2	<i>Rattus norvegicus</i> notch 2 (Notch2), mRNA
	reverse	GAG GTC GAG TAT TGG CAG TC		
<i>hes1</i>	forward	CTC TGA GCA CAG AAA GTC ATC	NM_024360.3	<i>Rattus norvegicus</i> hes family bHLH transcription factor 1 (Hes1), mRNA
	reverse	TTC ATG CAC TCG CTG AAG CC		
<i>vegfa</i>	forward	GCAGCGACAAGGCAGACTAT	NM_031836.2	<i>R. norvegicus</i> vascular endothelial growth factor A (Vegfa), transcript variant 1, mRNA
	reverse	GAGGGAGTGAAGGAGCAACC		
<i>actb</i>	forward	GAGATTACTGCCCTGGCTCC	NM_031144.3	<i>R. norvegicus</i> actin, beta (Actb), mRNA
	reverse	GCTCAGTAACAGTCCGCCTA		
<i>b2m</i>	forward	CTC GCT CGG TGA CCG TGA T	NM_012512.2	<i>R. norvegicus</i> beta-2 microglobulin (B2m), mRNA
	reverse	GGA CAG ATC TGA CAT CTC GA		
<i>gapdh</i>	forward	GCGAGATCCCGCTAACATCA	NM_017008.4	<i>R. norvegicus</i> glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh), mRNA
	reverse	CCCTTCCACGATGCCAAAGT		

Изучаемые гены можно разделить на несколько групп в зависимости от их функции (Таблица 3)

Таблица 3. Функциональные группы исследуемых генов

Провоспалительные цитокины 1. <i>Интерлейкин 1β - il1β,</i> 2. <i>Интерлейкин - il6,</i> 3. <i>Фактор некроза опухоли – tnfa</i>	Пролиферация гепатоцитов 1. <i>Фактор роста гепатоцитов - hgf,</i> 2. <i>Трансформирующий фактор роста β - tgfbβ,</i> 3. <i>Фактор роста фибробластов 2 - fgf2</i>
Противовоспалительные цитокины 1. <i>Интерлейкин 10 - il10</i>	Факторы миграции клеток 1. <i>Матричная металлопротеиназа-9 mmp9,</i> 2. <i>sdf1a</i>
NOTCH-сигналинг - сигнальный путь, регулирующий пролиферацию и дифференцировку гепатоцитов и холангиоцитов 1. <i>Notch1, notch2 – мембранные рецепторы,</i> 2. <i>Sox9, hes1, uap1 – транскрипционные факторы, экспрессия которых зависит от активности NOTCH-рецепторов</i>	Факторы ангиогенеза 1. <i>Эндотелиальный фактор роста - vegf,</i> 2. <i>Ангиогенин - ang</i>
TWEAK-сигналинг – сигнальный путь, регулирующий активность прогениторных клеток печени и пролиферацию холангиоцитов 1. <i>Tweak – ген секретируемого фактора TWEAK, относящийся к семейству TNF белков</i> 2. <i>Fn14 – ген рецептора к TWEAK</i>	Маркеры макрофагов 1. <i>Индукцируемая iNOs</i>
Гены домашнего хозяйства, эндогенный контроль	<i>actb, b2m, gapdh</i>

Для анализа экспрессии генов использовали метод определения порогового цикла (Ct) и вычисления относительной экспрессии гена по методу M.V. Pfaffl [2001] с учетом рекомендаций Vandesompele J. [Vandesompele J. et al., 2002]. В качестве эндогенного контроля использовали гены домашнего хозяйства *actin- β , b2m, gapdh*.

2.10 Получение клеточных культур и культивирование МСК пупочного канатика крыс

МСК пупочного канатика крысы получали обработкой вартонова студня смесью ферментов: коллагеназы I типа и диспазы (“Invitrogen”, США). Изолированные клетки переносили в культуральную среду на основе DMEM/F12 («ПанЭко», Россия) с добавлением фетальной бычьей сыворотки (“РАА Lab.”, Австрия) до 10% и пенициллина-стрептомицина («ПанЭко», Россия) до 1%. Пересев клеток на новые культуральные флаконы проводили при достижении клетками 80-90% монослоя. Для иммунофенотипирования и дифференцировки использовали МСК на 3 пассаже.

2.11 Подготовка к иммунофенотипированию

Клетки снимали с культуральных флаконов с помощью раствора трипсина-Версена («ПанЭко», Россия) и разводили в ФСБ pH=7,4 («ПанЭко», Россия) до концентрации не более 1×10^7 кл/мл. Иммунофенотипирование проводили с помощью набора антител MSC Analysis Kit (BD Stemflow™) в соответствии с рекомендациями производителя. В центрифужную микропробирку вносили антитела (4-20 мкл), затем по 100 мкл клеточной суспензии и инкубировали при комнатной температуре в темноте 30 минут. Затем клетки дважды отмывали от неприкрепившихся антител буферным раствором и разводили в 300-500 мкл ФСБ. Анализ проб проводили на цитофлуориметре FACSCalibur (“BD Biosciences”). Результаты обрабатывали с помощью программы WINMDI 2.8.

2.12 Оценка дифференцировочного потенциала

При достижении клетками 70-80% конfluence на 3 пассаже культуральную среду заменяли на дифференцировочную. В качестве контроля использовали те же культуры МСК пупочного канатика крыс без добавления дифференцировочной среды. Смену среды на свежую производили два раза в неделю. Визуальный контроль клеточных культур производили каждый день с помощью световой микроскопии.

Для оценки адипогенеза клетки отмывали от среды фосфатно-солевым буфером (pH 7,4), далее проводили фиксацию свежеприготовленным охлажденным 4% раствором параформальдегида на ФСБ pH=7,4 и окрашивали Oil Red O ("BioVitrum", Россия).

Для оценки остеогенеза клетки отмывали от среды фосфатно-солевым буфером (pH 7,4), проводили фиксацию 70% этаноловым спиртом и окрашивали 40 мМ раствором ализаринового красного S pH=4,1 ("Sigma-Aldrich", США), время инкубации 3-5 минут.

Для оценки хондрогенеза клетки отмывали от среды фосфатно-солевым буфером, проводили фиксацию свежеприготовленным охлажденным 4% раствором параформальдегида и окрашивали 1% раствором альцианового синего ("BioVitrum", Россия) в 3% уксусной кислоте в течение ночи при pH=2,5 (для лучшего проникновения красителя).

Для оценки ангиогенного потенциала первичную культуру МСК выделяли из вартонова студня пупочного канатика человека (n=5). В качестве эндотелиоцитов использовали линию Ea.hy926, полученную гибридизацией первичной эндотелиальной линии HUVEC с клетками карциномы легкого A549. Для клеток данной линии характерно сохранение основных морфологических, фенотипических и функциональных свойств, присущих

клеткам эндотелия кровеносных сосудов. Для верификации качества линии в клетках методом иммуноцитохимического окрашивания подтверждали экспрессию маркера эндотелия CD31 (антитела ab24590, “Abcam”). В качестве матрикса базальной мембраны использовали “BD Matrigel Basement Membrane Matrix Phenol Red Free” (кат. № 356237, “BD”) Подготовку материала проводили в соответствии с рекомендациями производителя. Непосредственно перед экспериментом МСК пупочного канатика метили мембранным трейсером PKN26 (эмиссия в красной области), а ЭК Ea.hy926 —трейсером PKN67 (эмиссия в зеленой области) в соответствии с рекомендациями производителя (“Sigma Aldrich”). Для моделирования ангиогенеза суспензию клеток (МСК пупочного канатика человека, ЭК Ea.hy926 или два типа клеток в соотношении 1:1) аккуратно наносили на полимеризованный матрикс из расчета 35 тыс. клеток на лунку 48-луночного планшета. Для каждого типа суспензии использовали не менее 3 лунок.

Наблюдение за клетками осуществляли при помощи инвертированного микроскопа “Axiovert40 CFL” (“Carl Zeiss”) и Time-Lapse микроскопа “IncuCyte Zoom” (“Essen BioScience”). Формируемые в матрикеле структуры переносили в среду для заключения “Tissue-Tek OCTCompound” (“Sakura Finetek”) и замораживали при -70оС. Криосрезы толщиной 5-7 мкм окрашивали на маркер эндотелия CD31 (антитела ab24590, “Abcam”).

2.13 Оценка функционального состояния митохондрий

Фракционирование митохондрий

Эксперименты проводили на митохондриях, выделенных методом дифференциального центрифугирования [Knorre D.A. et al., 2003] с модификациями: гомогенат печени ресуспендировали в среде для изоляции митохондрий (medium B1 + 0.5 мМ EGTA, Fontana-Ayoub et al., 2014). После 2-го центрифугирования митохондрии ресуспендировали в среде medium

A1+0.5 mM EGTA (Fontana-Ayoub et al., 2014): первое центрифугирование – 10 мин, 1000 g, 2-е и 3-е – 17 минут, 7200 g. В течение дальнейшего эксперимента флакон с выделенными митохондриями хранили на льду.

Анализ дыхательной активности выделенного препарата митохондрий

Функциональное состояние митохондрий оценивали по скорости потребления кислорода при температуре 25°C с помощью оксиграфа (Hansatech, UK). В ячейку оксиграфа, содержащую 2 мл среды MIR05 [Gnaiger E. et al., 2000], вносили 0,6 мг белка митохондрий. Измеряли базовую скорость дыхания митохондрий. После этого измеряли скорость дыхания после последовательного добавления глутамата и малата (конечная концентрация в ячейке 5 и 1,25 mM), ротенона (конечная концентрация 1 мкМ), сукцината (концентрация в ячейке 5 mM). Рассчитывали коэффициент АДФ/О (отношение фосфорилированного АДФ к количеству кислорода, затраченного на процесс фосфорилирования при окислении сукцината) после добавления 1 мкл 0.1 М АДФ. После того как добавленный АДФ был полностью фосфорилирован к митохондриям вносили АДФ до конечной концентрации 0.5мМ для оценки максимальной возможной скорости сопряженного дыхания. Целостность митохондриальных мембран оценивали, измеряя величину приращения скорости дыхания после добавления цитохрома С (до конечной концентрации 0.1 мкМ) на фоне сукцината и АДФ. Добавление ингибитора АТФазы олигомицина (концентрация в ячейке 2,5 мкМ) на фоне сукцината позволяло оценить вклад дыхания, связанного с компенсацией утечки протонов. Максимальную скорость несопряженного дыхания измеряли после добавления разобщителя карбонилцианид-4-(трифторометокси)-фенилгидразона (FCCP). FCCP добавляли порциями по 2 мкл 10⁻⁴ М раствора до достижения максимальной скорости. После добавления малоната до конечной концентрации 2мМ и цианида калия до

конечной концентрации 0.5мМ измеряли скорость немитохондриального потребления кислорода системой. Скорость дыхания измеряли в нмоль/мин и нормировали на количество белка в ячейке.

Определение содержания митохондриальных цитохромов

В выделенных митохондриях определяли содержание цитохромов типов а, b и c по описанной методике [Monge C. et al., 2008]. Дифференциальный спектр поглощения восстановленных/окисленных цитохромов записывали в двухлучевом режиме на спектрофотометре Cary300 UV-VIS, Agilent Technologies. Для обсчета высоты пиков на спектрах поглощения была использована программа OriginPro.

Определение содержания белка

Содержание белка в полученной суспензии определяли, измеряя его концентрацию биуретовым методом [Северин С.Е., Соловьева Г.А., 1989] с помощью спектрофотометра Biorad SmartSpec Plus. Выход фракции митохондрий оценивали, рассчитывая отношение количества митохондриального белка, полученного после выделения митохондрий, к массе исходной ткани.

2.14 Статистический анализ

Полученные данные анализировали с помощью программы SigmaStat 3.5 (Systat Software Inc, США). Сравнение двух выборочных долей проводили с помощью z-критерия. Полученные относительные экспрессии сравнивали с помощью критерия Манна-Уитни (U). При сравнении более двух групп использовали ранговый однофакторный дисперсионный анализ. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 ДИНАМИКА РЕПАРАТИВНОГО ПРОЦЕССА В ПЕЧЕНИ ПОСЛЕ СУБТОТАЛЬНОЙ РЕЗЕКЦИИ У КРЫС

3.1.1 Гистологические изменения регенерирующей печени крыс после субтотальной резекции

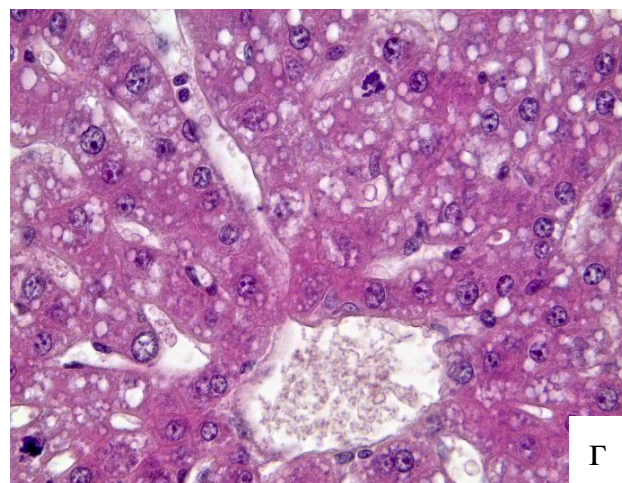
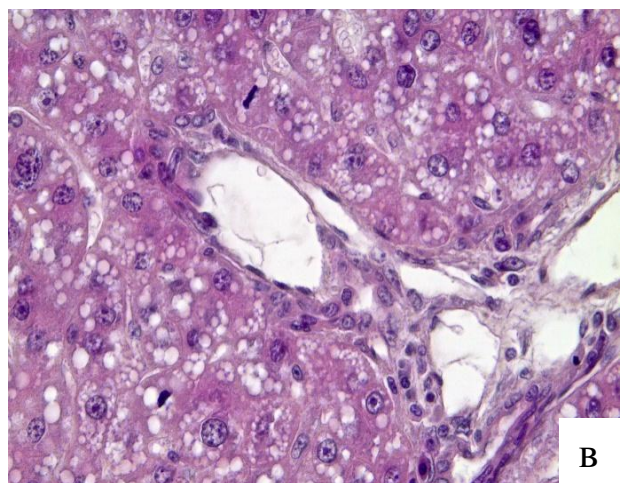
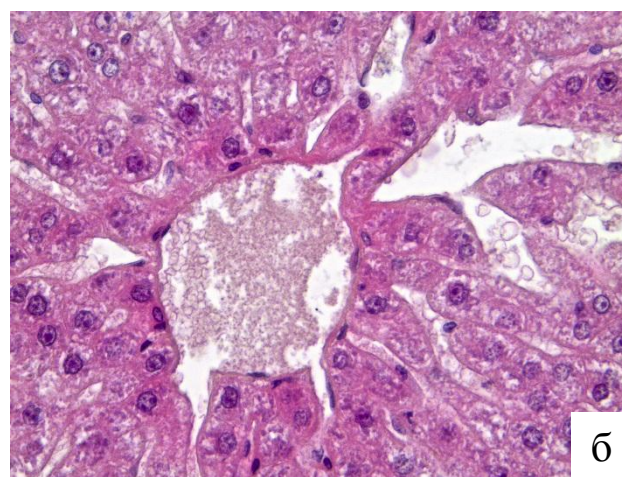
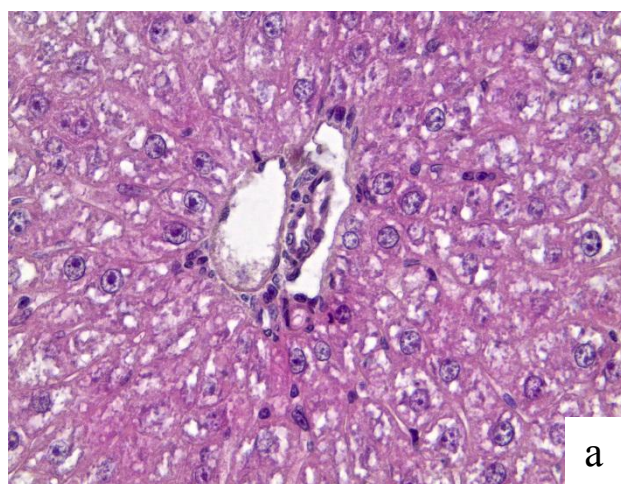
Паренхима печени неоперированных крыс представлена гепатоцитами, организованными в балки, имеющие радиальное направление. В паренхиме печени можно выделить классические дольки с нечеткими границами, в центре располагалась центральная вена, по периферии – портальные тракты. Среди гепатоцитов полностью отсутствовали митотически делящиеся клетки, изредко встречали двоядерные клетки. Эпителий желчных протоков был представлен низкими кубическими клетками, делящиеся клетки среди холангиоцитов также отсутствовали.

После субтотальной резекции на всех сроках исследований печень состояла из балок гепатоцитов, организованных в печеночные дольки. Через 1 сутки после резекции в цитоплазме гепатоцитов обнаруживались жировые капли, которые полностью исчезали к 10 суткам после субтотальной резекции (Рис.1а,б).

Через 2 и 3 суток после субтотальной резекции в печени подопытных животных обнаруживалось множество митотически делящихся гепатоцитов, единичные фигуры митоза встречались и в билиарном эпителии (Рис.1в,г). Большое количество делящихся гепатоцитов обнаруживалось вплоть до 7 суток после операции, далее их становилось меньше. Однако единичные фигуры митозов встречались и через 10 суток после операции. На завершающих

этапах регенерации среди гепатоцитов чаще встречались двоядерные клетки.

Микроскопическое строение печени крыс после завершения восстановления массы не отличалось от строения неоперированной печени (Рис.1д,е). Исходя из этого, можно заключить, что на тканевом уровне регенерация печени крыс после субтотальной резекции протекала органотипически.



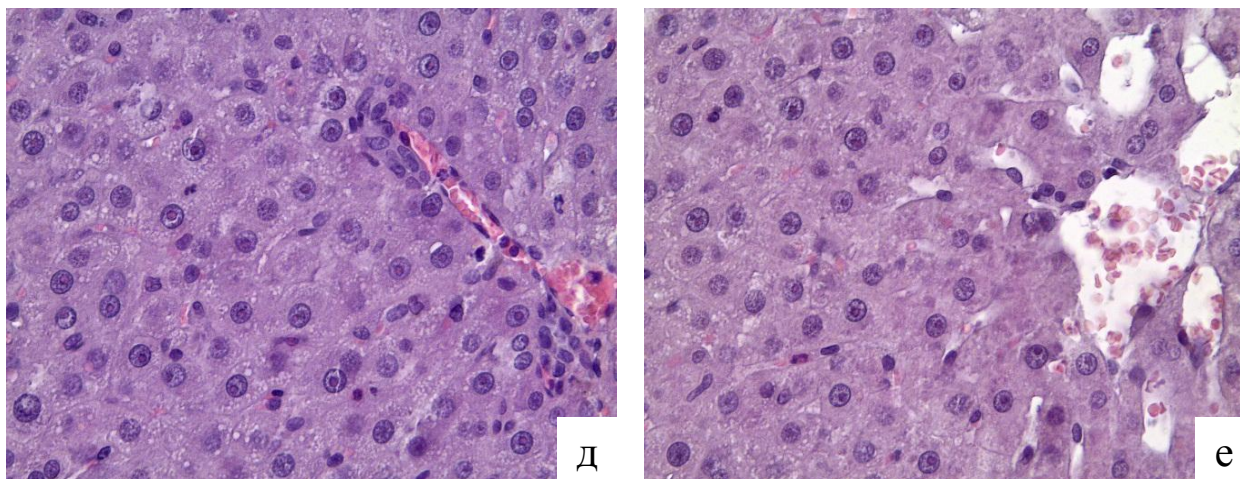


Рис.1. Строение печени после субтотальной резекции печени крыс: а – портальная триада через 1 сутки после субтотальной резекции, б – центральная вена через 1 сутки после субтотальной резекции, в – портальная триада 7 суток после субтотальной резекции, г – центральная вена 7 суток после субтотальной резекции, д - портальная триада через 10 суток после субтотальной резекции, е - центральная вена через 10 суток после субтотальной резекции, окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 400$.

3.1.2 Выживаемость животных

Смертность животных после субтотальной резекции составила примерно 50%, при этом гибель крыс отмечена только в первые двое суток после операции, что согласуется с литературными данными [Романова Л.К., 1984]. Причиной высокой смертности оперированных животных была острая печеночно-клеточная недостаточность, что подтверждается снижением концентрации альбумина и повышением активности АЛТ в сыворотке крови оперированных крыс через 3 суток после воздействия по сравнению с контролем ($p < 0,05$, Рис.3 а,б).

3.1.3 Восстановление массы и функции печени

Через 10 суток после резекции масса печени у подопытных животных не отличалась от массы печени контрольных крыс ($p>0,05$, Рис. 2 а,б). Кроме того, к этому же сроку концентрация альбумина и активность АЛТ в сыворотке крови оперированных крыс не отличалась от показателей контрольных животных ($p>0,05$, Рис. 3 а,б). Таким образом, можно заключить, что регенерация печени крыс после субтотальной резекции завершается в течение 10 суток.

Субтотальная резекция печени для крыс является тяжелой травмой, что подтверждается высокой смертностью подопытных животных. У выживших животных масса печени постепенно нарастала и к 10 суткам после операции не отличалась от контрольных значений. Наибольший прирост массы печени наблюдали между 3 и 7 сутками после резекции, при этом к 7 суткам происходит восстановление биохимических показателей функции печени. Полученные нами результаты согласуются с данными других исследователей [Ninomiya M. et al., 2010]. Сроки восстановления массы печени после субтотальной резекции приблизительно соответствуют времени регенерации печени после частичной гепатэктомии (удаление 70% массы органа) [Michalopoulos G.K., DeFrances M.C., 1997].

А



Б

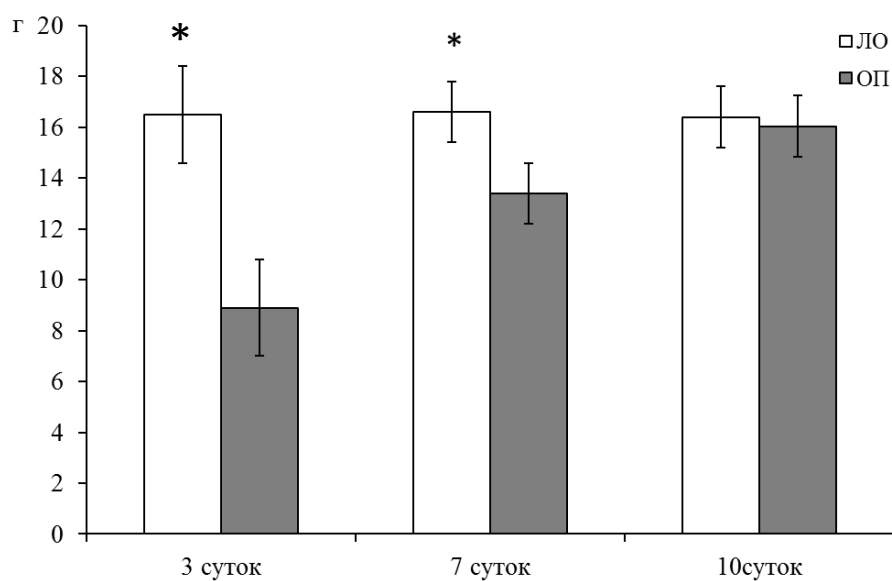


Рис.2. Восстановление массы печени у крыс после субтотальной резекции. Белые столбики – ложно оперированные, серые – оперированные, по оси абсцисс – срок после операции, по оси ординат – масса печени в г, представлены средние значения с доверительными интервалами, * – статистически значимые различия между оперированными и ложно оперированными животными ($p < 0,05$).

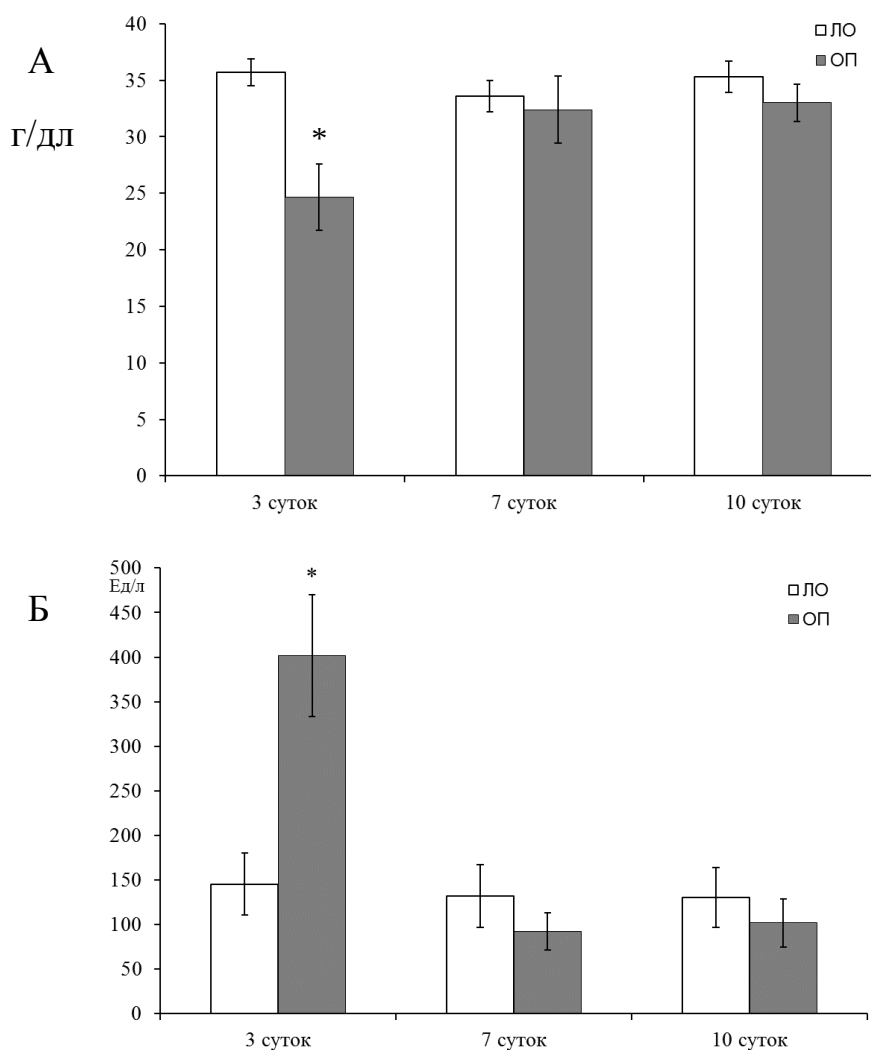


Рис. 3. Восстановление функциональных показателей печени после субтотальной резекции. А. Динамика уровня альбумина в сыворотке крови после субтотальной резекции, по оси абсцисс – срок после операции, по оси ординат – концентрация альбумина в г/дл. Б. – Динамика активности АЛТ в сыворотке крови оперированных крыс, по оси абсцисс – срок после операции, по оси ординат – активность АЛТ в Ед/л. Белые столбики – ложно оперированные (ЛО), серые – оперированные (ОП), представлены средние значения с доверительными интервалами, * - статистически значимые различия между оперированными и ложно оперированными животными ($p < 0,05$)

3.2 ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕПАТОЦИТОВ ПЕЧЕНИ КРЫС ПОСЛЕ СУБТОТАЛЬНОЙ РЕЗЕКЦИИ

Пролиферативная активность гепатоцитов регенерирующей печени изучалась путем подсчета митозов, а также с помощью иммуногистохимического маркера пролиферации Ki67. В 1 сутки после резекции митотически делящиеся гепатоциты в оперированной печени отсутствовали (Рис.4, Рис.5а). Наибольших значений митотический индекс гепатоцитов достигал через 48-72 ч (МИ=9,4±1,5‰), и 7 суток после операции (МИ=5,2±1,1‰) (Рис.4 б,в, Рис.5). При этом делящиеся гепатоциты располагались равномерно, приуроченность к какому-либо компартменту печеночной долики отсутствовала, часто можно было видеть группы из нескольких делящихся гепатоцитов. Кроме того, несмотря на восстановление массы печени к 10 суткам после операции, мы наблюдали единичные митозы среди гепатоцитов на этом сроке (Рис.5), что свидетельствовало о продолжающемся морфогенезе.

В печени интактных животных Ki67+клетки встречались крайне редко, судя по размеру и локализации, это были в основном клетки билиарного эпителия. Экспрессия Ki67 в гепатоцитах интактной печени, видимо, связана с физиологическим процессом полиплоидизации паренхиматозных клеток (Рис.6а,б).

После субтотальной резекции единичные Ki67+ гепатоциты появляются только через 30 ч после вмешательства (Рис.6г, Рис.7), наибольшее значение индекса Ki67+ наблюдалось через 48 ч после резекции, ИнKi67=28,2±2,9‰) (Рис.7). При сопоставлении динамики митотической активности гепатоцитов и экспрессии Ki67 обнаружено, что через 5 суток происходит уменьшение числа митотически делящихся гепатоцитов (МИ=2,0±0,5‰) на фоне

большого числа Ki67+гепатоцитов ($\text{ИнKi67}=8,9\pm1,8\%$), что свидетельствовало о задержке вступления гепатоцитов в митоз (Рис.5, Рис.7).

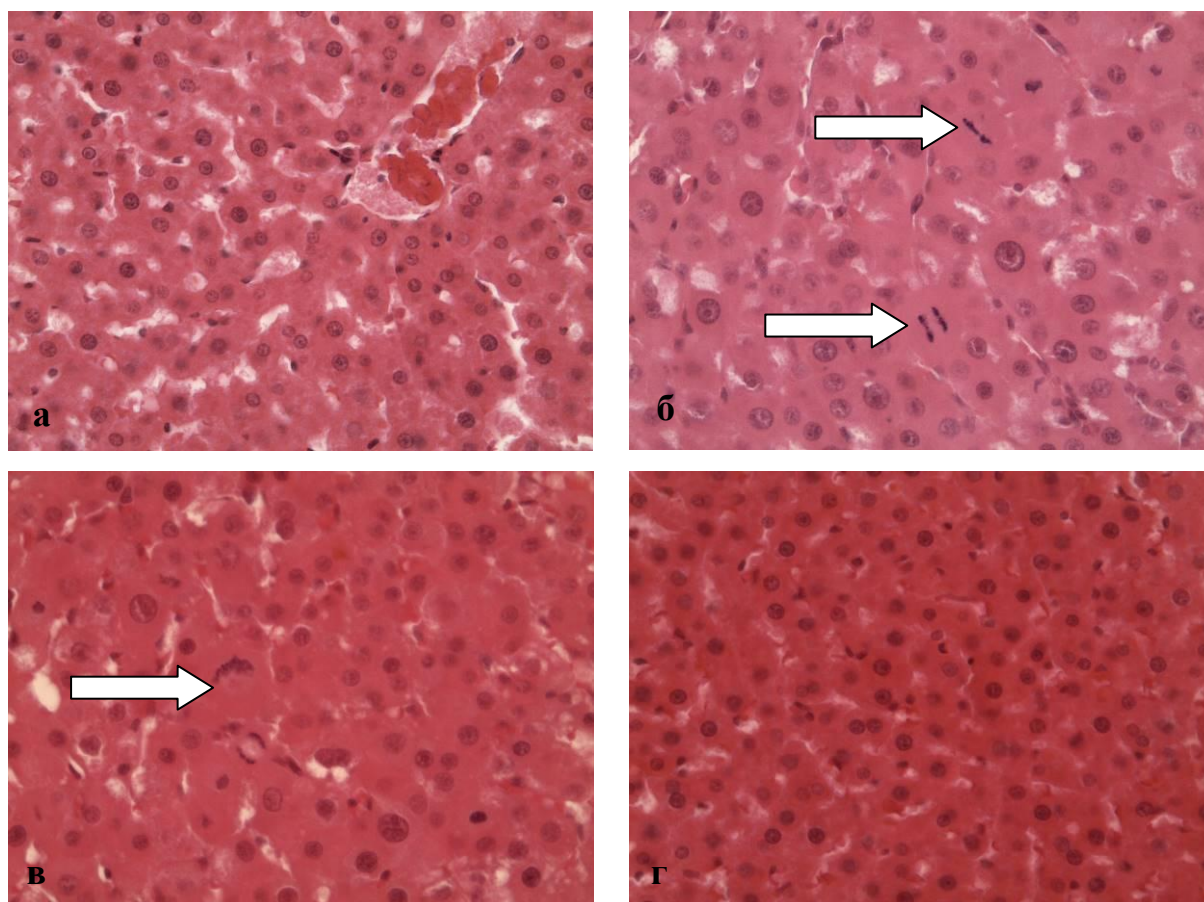


Рис.4. Митотическая активность гепатоцитов после субтотальной резекции печени крыс. Митозы на разных сроках после субтотальной резекции печени крыс (указаны белыми стрелками): а – интактный контроль, б – 3 суток после субтотальной резекции, в – 7 суток после субтотальной резекции, г – 10 суток после субтотальной резекции, окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 400$.

Наибольшее количество делящихся гепатоцитов встречалось через 2-3 суток после операции.

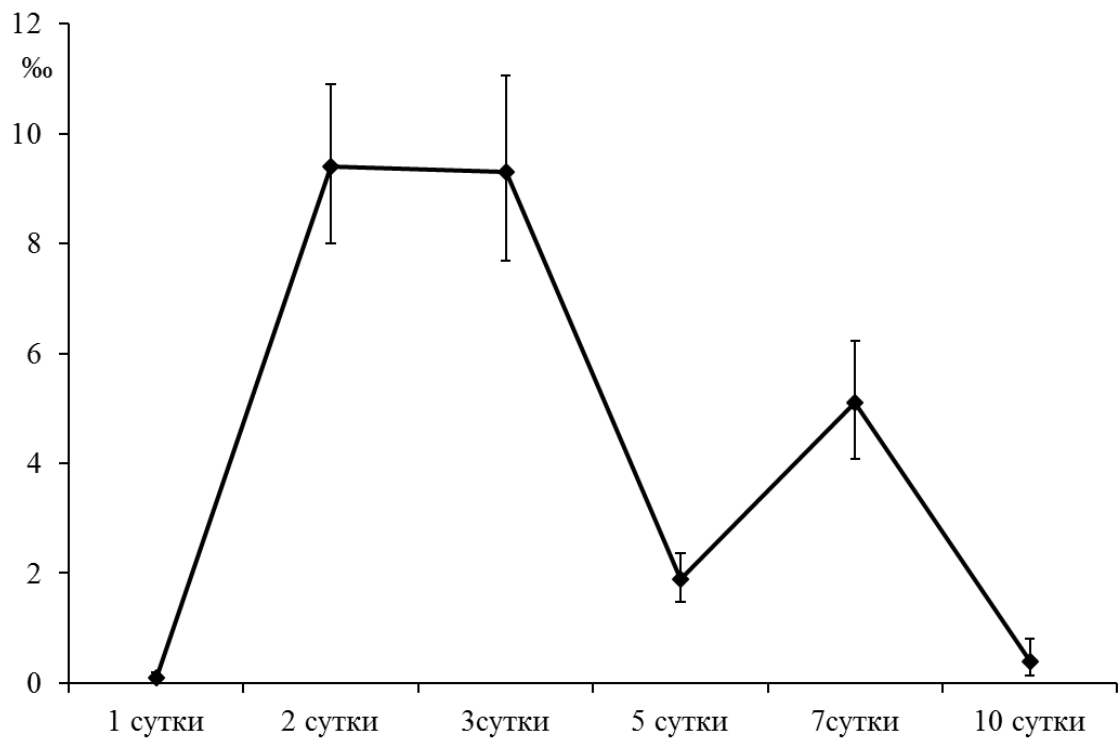
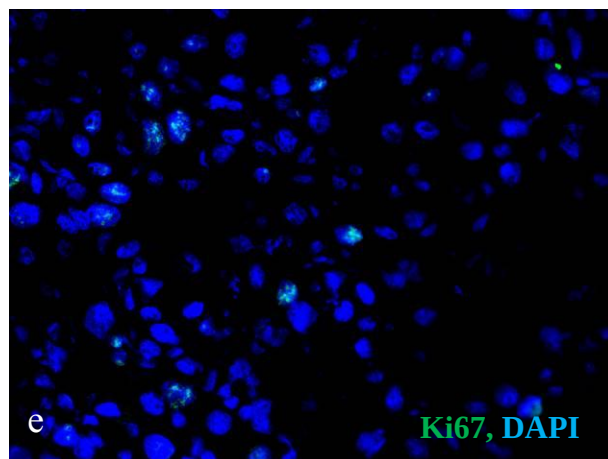
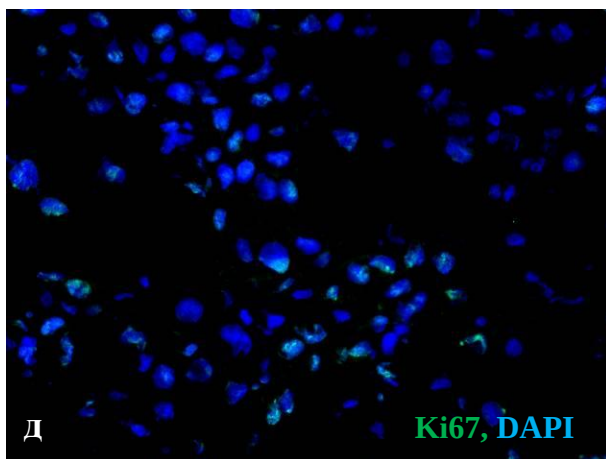
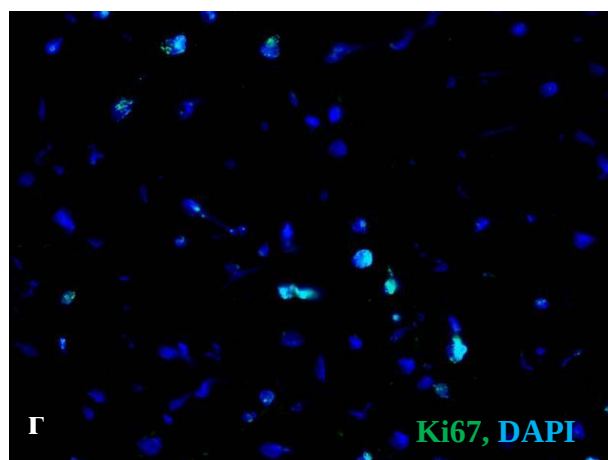
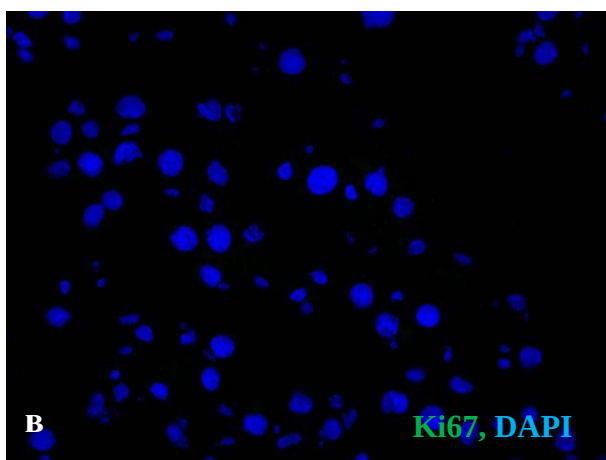
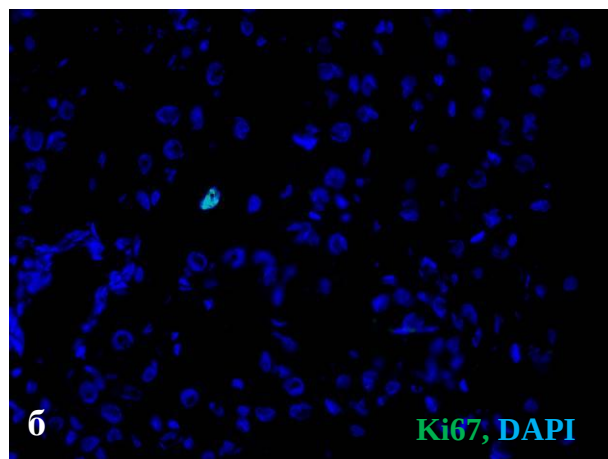
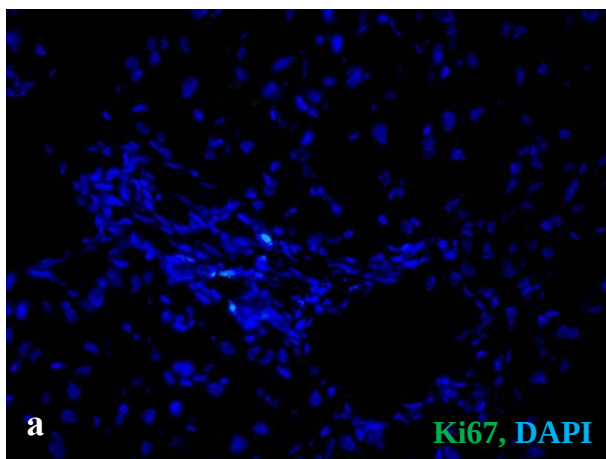


Рис.5. Митотическая активность гепатоцитов после субтотальной резекции печени крыс. Динамика митотического индекса после субтотальной резекции печени крыс. По оси абсцисс – срок после операции, по оси ординат – митотический индекс в ‰. Представлены средние значения с доверительными интервалами

Отмечается две волны митотического размножения гепатоцитов после субтотальной резекции: через 2-3 суток после резекции и через 7 суток.



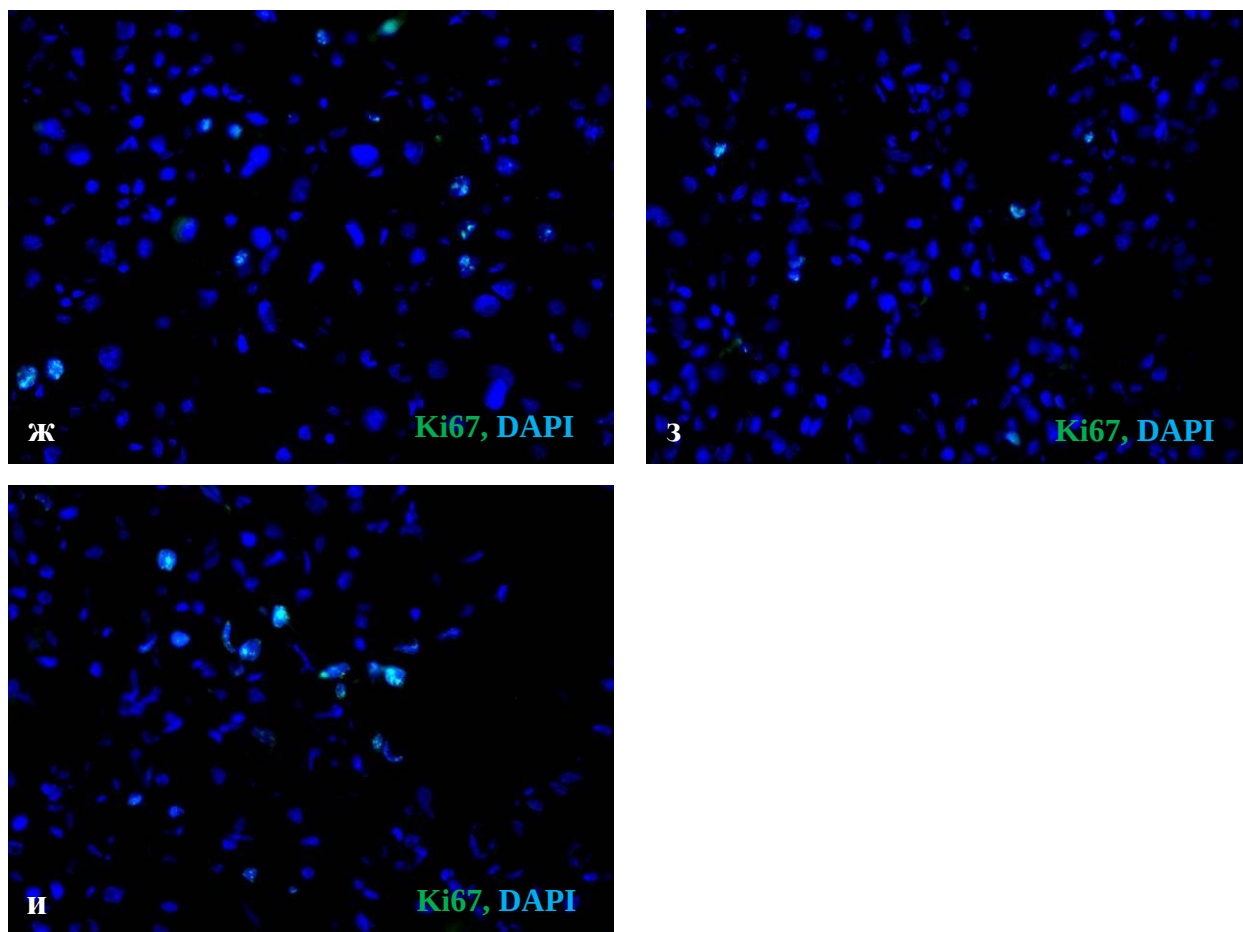


Рис. 6. Экспрессия Ki67 в регенерирующей печени крыс после субтотальной резекции. Иммуногистохимическое исследование: а,б – интактный контроль, в – через 24 часа после субтотальной резекции, г – через 30 часов, д – через 48 часов, е – через 3 суток, ж – через 5 суток, з – через 7 суток, и – через 10 суток после субтотальной резекции. Флуоресцентная микроскопия: маркер Ki67 визуализировался с помощью вторых антител, конъюгированных с FITC - зеленое свечение, докраска ядер DAPI – синее свечение, $\times 400$.

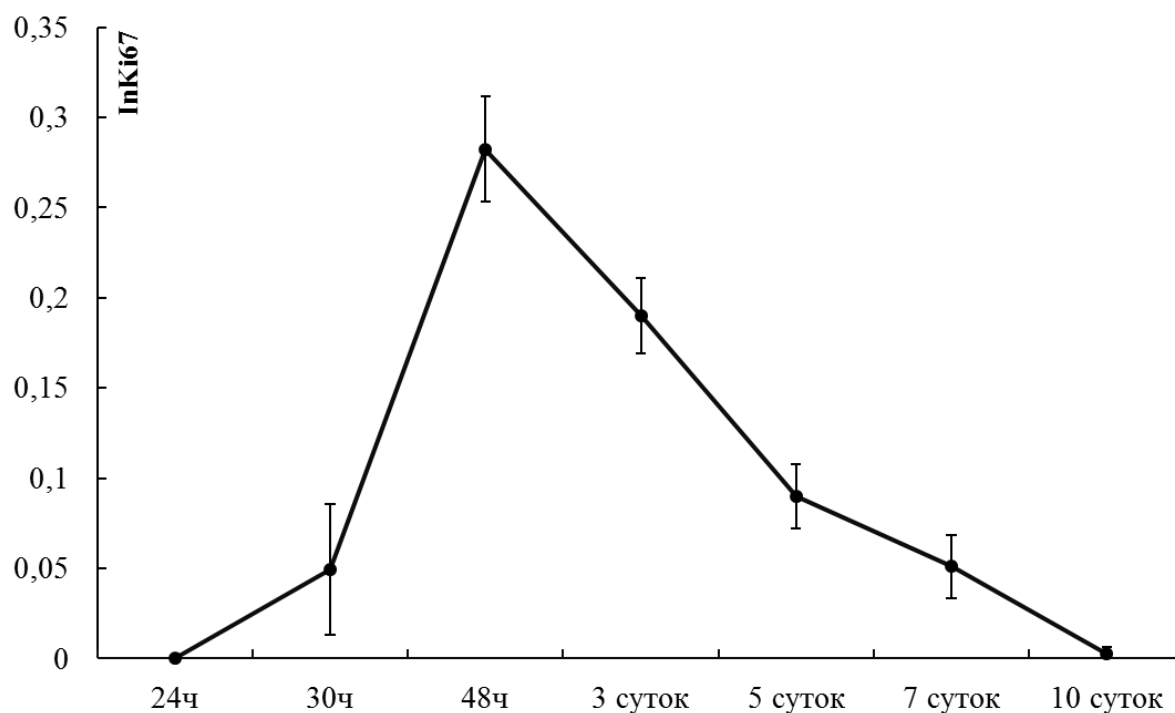


Рис. 7. Динамика индекса Ki67 после субтотальной резекции печени крыс, по оси абсцисс – срок после операции, по оси ординат – митотический индекс в %, представлены средние значения с доверительными интервалами.

Статистически значимое повышение количества гепатоцитов, экспрессирующих Ki67 отмечается через 30 ч после субтотальной резекции, наибольшее количество гепатоцитов, экспрессирующих Ki67 обнаруживается через 48 часов после субтотальной резекции.

3.3 РОЛЬ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ В РЕГЕНЕРАЦИЮ ПЕЧЕНИ КРЫС ПОСЛЕ СУБТОТАЛЬНОЙ РЕЗЕКЦИИ

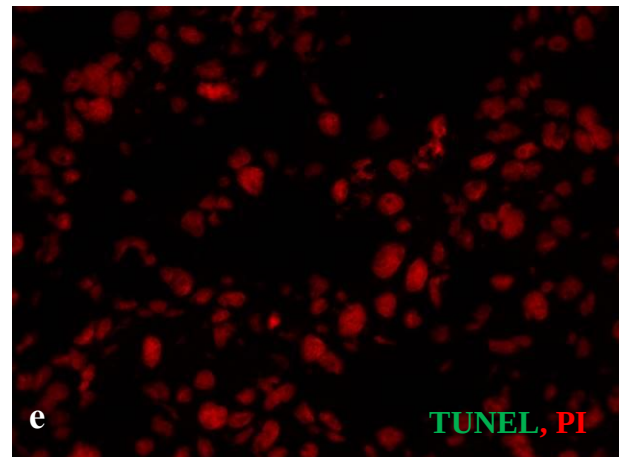
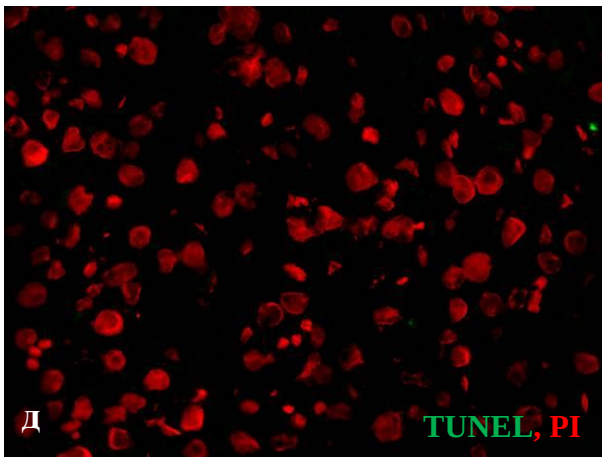
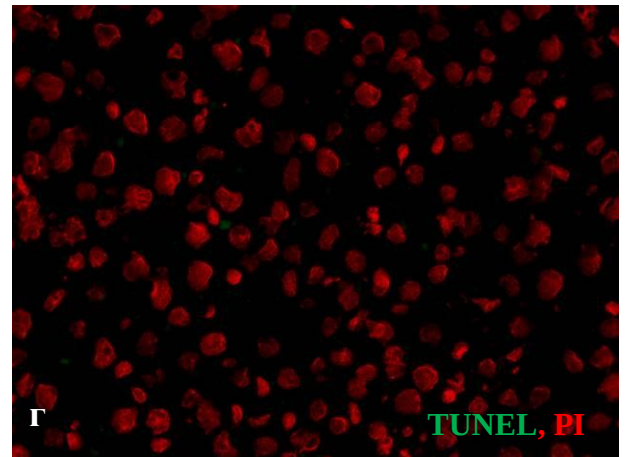
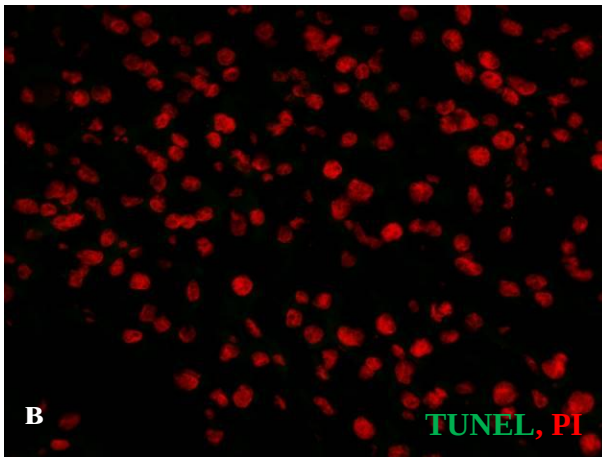
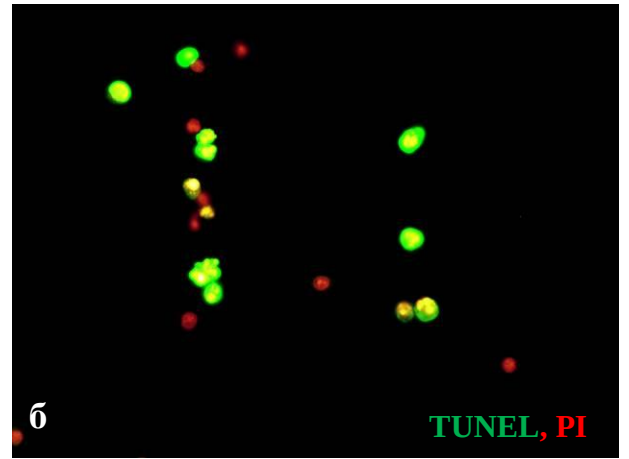
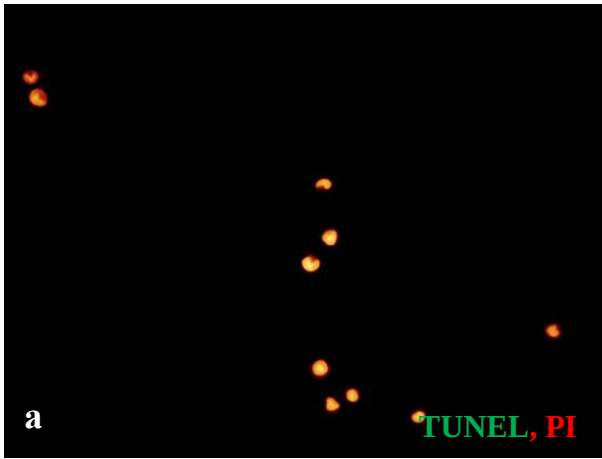
Отмечено, что в ходе регенерации печени после резекции разного объема вслед за волной пролиферации гепатоцитов наблюдается небольшой подъем частоты апоптотической гибели гепатоцитов [Michalopoulos G.K., DeFrances M.C., 1997].

Уровень апоптоза изучался с помощью метода TUNEL (Рис.8), который выявляет разрывы молекулы ДНК, а также с помощью иммуногистохимического определения экспрессии каспазы 3 в цитоплазме клеток (Рис.9). Ни на одном из изучаемых сроков большого количества гибнущих гепатоцитов не выявлено (Рис.7, Рис.8).

Стоит отметить, что экспрессия гена *tnfa* в печени после субтотальной резекции повышалась однократно и только на позднем этапе регенерации (Рис.12б), с этим согласовывались данные по содержанию белка TNFα, который считается главным индуктором апоптоза гепатоцитов в регенерирующей печени крыс (рис. 10а,б).

При изучении содержания TNFα методом вестерн-блот в регенерирующей печени крыс после субтотальной резекции в печени практически полностью исчезал TNFα (Рис.12а,б), его количество восстанавливалось только к окончанию репаративного процесса. Возможно, что таким образом осуществляется защита пролиферирующих гепатоцитов от апоптотической гибели, индуктором которой в печени является TNFα [Fausto N. et al., 2006].

Таким образом, в нашей работе не получено данных, подтверждающих ведущую роль апоптоза и TNFα в повреждении печени после субтотальной резекции.



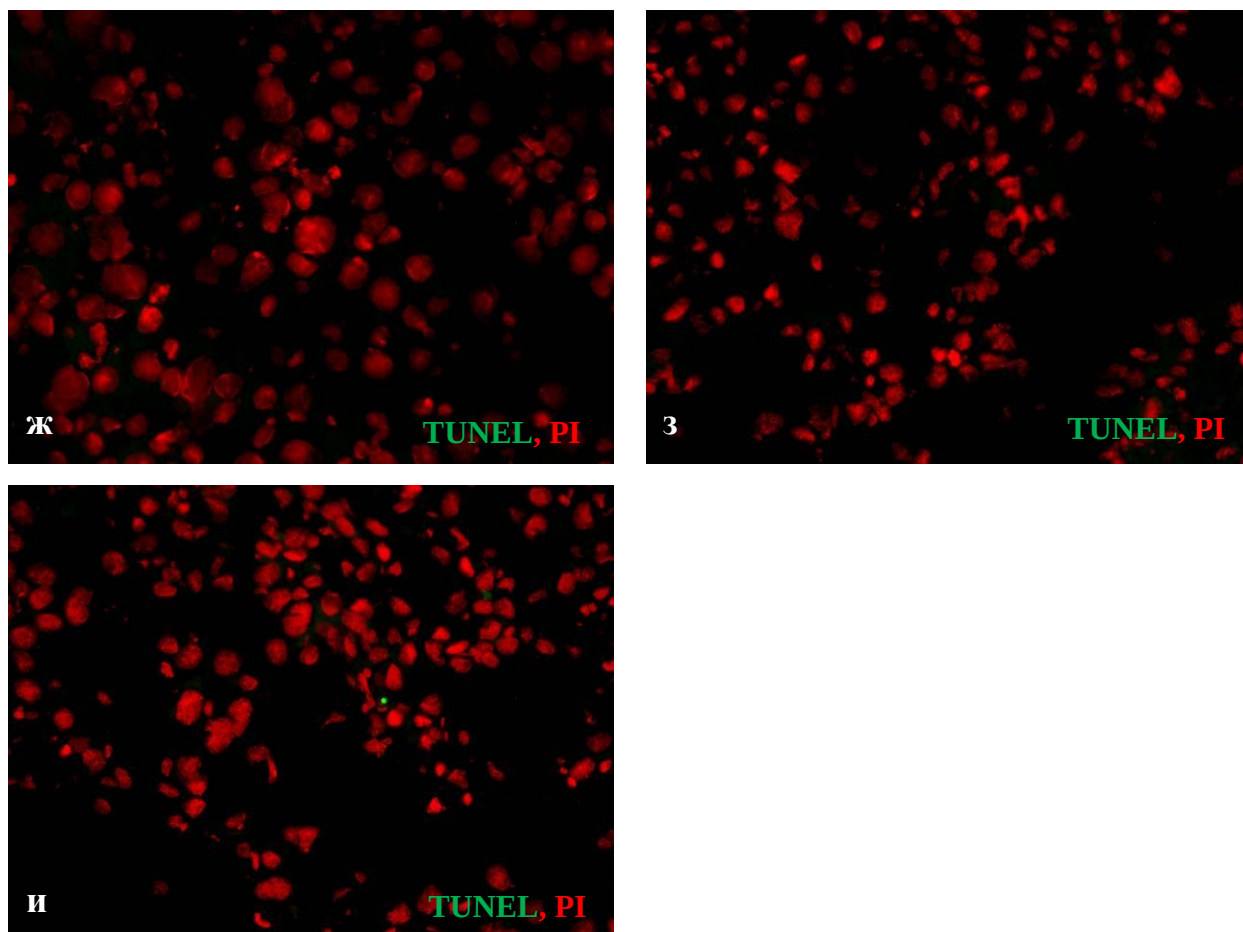
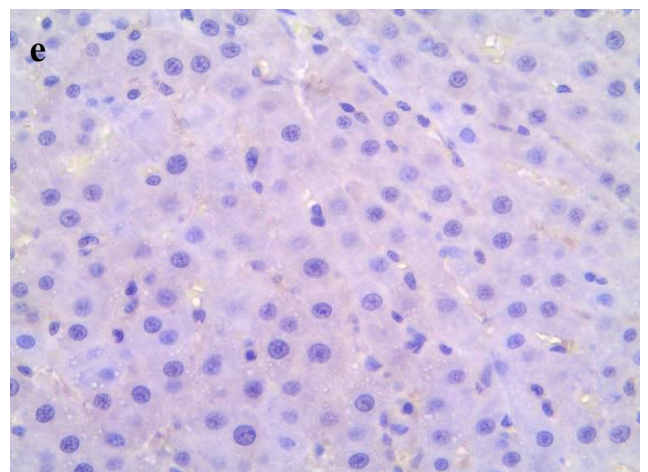
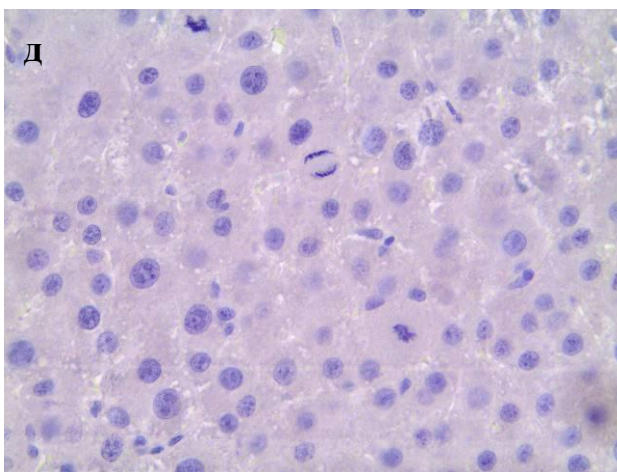
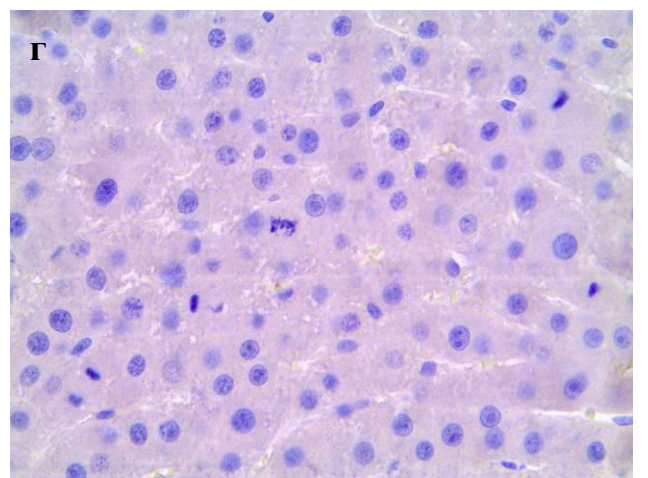
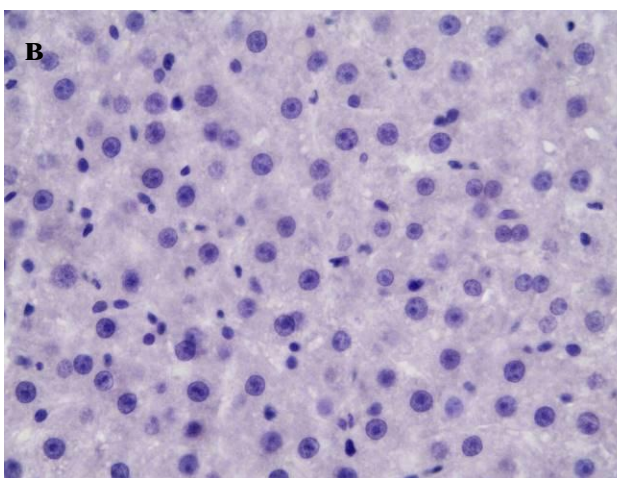
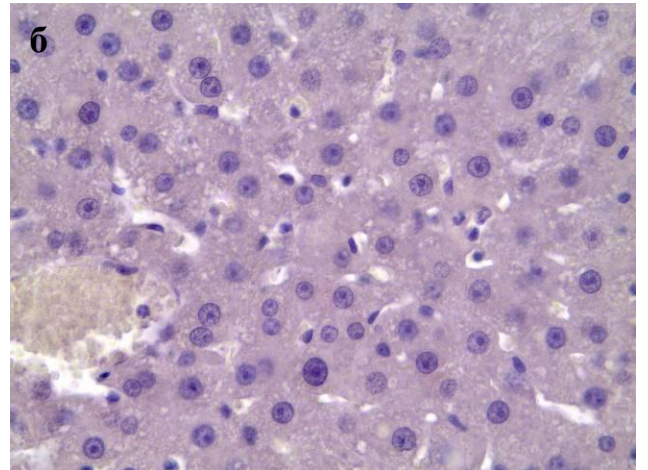
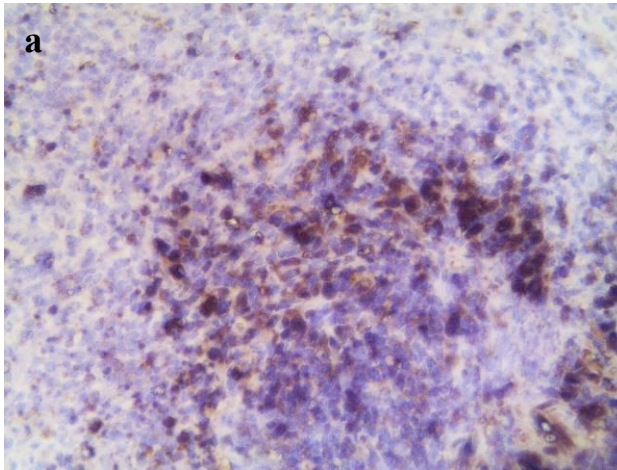


Рис.8 Клеточная гибель в регенерирующей печени после субтотальной резекции у крыс с помощью метода TUNEL: а – отрицательный контроль, б – положительный контроль, в – интактный контроль, г – через 1 сутки после субтотальной резекции, д – через 2 суток, е – через 3 суток, ж – через 5 суток, з – через 7 суток, и – через 10 суток, флуоресцентная микроскопия: TUNEL - зеленое свечение, докраска ядер PI – красное свечение, $\times 400$.



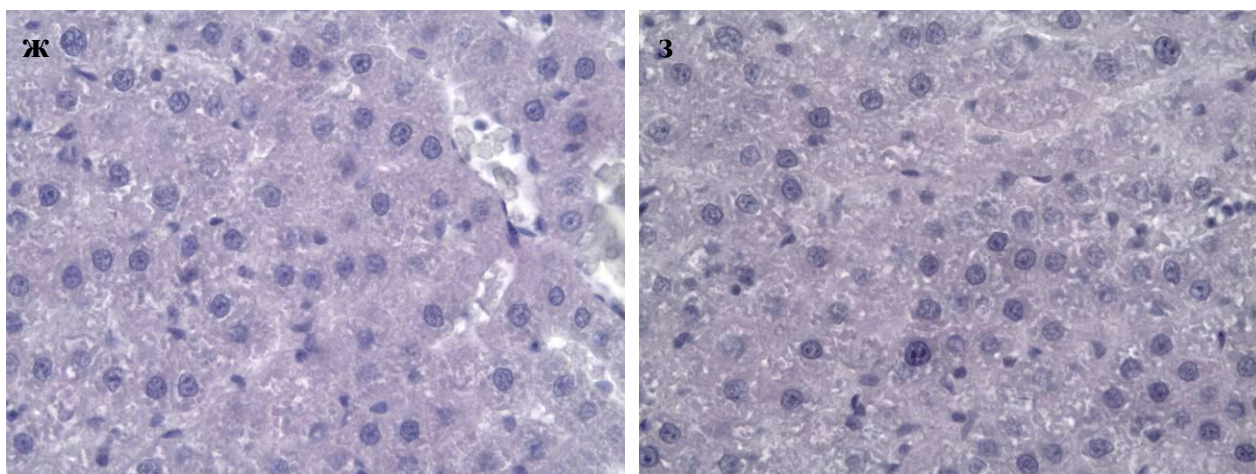
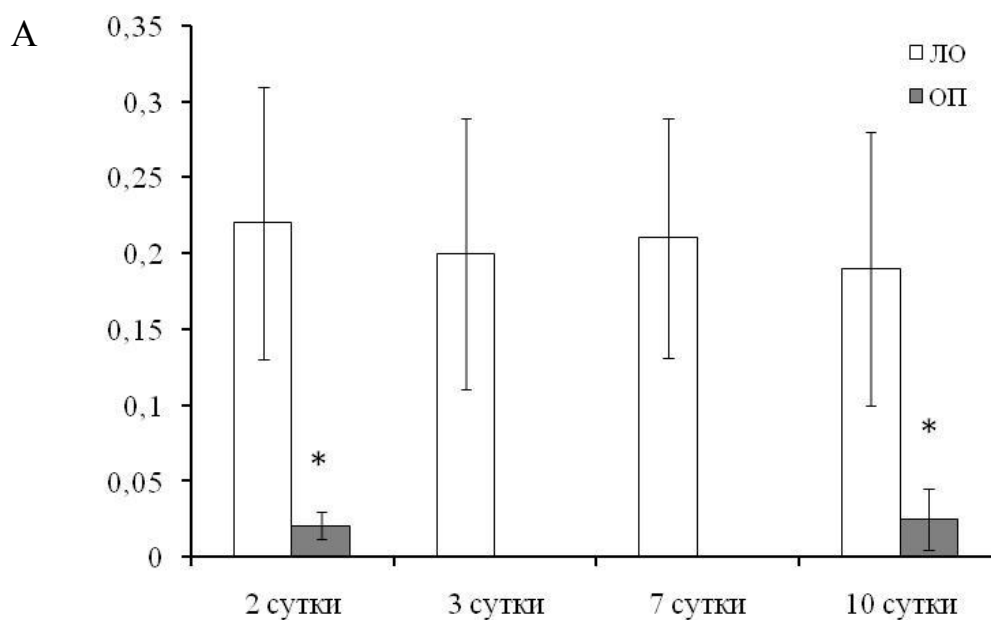


Рис.9. Экспрессия Caspase 3 в печени крыс после субтотальной резекции, иммуногистохимическое исследование: а – позитивный контроль, интактная селезенка крыс, б – контроль, в – через 1 сутки, г – через 2 суток, д – через 3 суток, е – через 5 суток, ж – через 7 суток после субтотальной резекции ядра докрашены гематоксилином, ж – через 10 суток после субтотальной резекции ядра докрашены гематоксилином, $\times 400$.

В печени крыс после субтотальной резекции экспрессии caspase 3 не обнаружено.



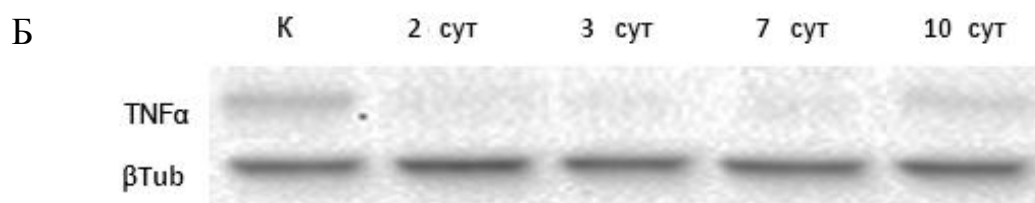


Рис. 10 Вестерн-блот белка TNFα в печени крыс после субтотальной резекции. А. Денситометрический анализ вестерн-блота TNFα. По оси абсцисс – время после операции, по оси ординат – относительная экспрессия белка. Белые столбики – ложно оперированные животные (ЛО), серые столбики – оперированные животные (ОП). Данные представлены в виде средних и доверительных интервалов.

Б. Вестерн-блот TNFα.

* - статистически значимые различия между оперированными и ложно оперированными животными ($p < 0,05$).

После субтотальной резекции и последующей регенерации количества белка TNFα в печени резко снижалось.

3.4. ДИНАМИКА ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ РЕГУЛЯТОРНЫХ МОЛЕКУЛ В ПЕЧЕНИ ПОСЛЕ СУБТОТАЛЬНОЙ РЕЗЕКЦИИ

При изучении экспрессии генов цитокинов и факторов роста в печени (Таблица 2, Таблица 3) обнаружено, что в зависимости от реакции на субтотальную резекцию печени все рассматриваемые гены можно разделить на три группы (Рис.11, Рис.12, Рис.13, Рис.16). Первая группа объединяет гены, экспрессия которых достоверно повышалась по сравнению с контролем в ранний период (3-48ч) регенерации печени после субтотальной резекции. К этим генам относятся гены провоспалительного цитокина *il6* и противовоспалительно цитокина *il10*, маркера макрофагов *iNOs*, матричной металлопротеиназы *mtpr9*, факторов роста, влияющих на пролиферацию гепатоцитов *fgf2*, *tgfb*, рецептора

TWEAK *fn14*, **ген-маркер недифференцированных клеток** *sox9* (Рис.11). Ко второй группе генов, экспрессия которых статистически значимо повышалась на поздних сроках регенерации (5-10 сутки), относятся **гены провоспалительных цитокинов** *il1b*, *tnfa*, **ген, влияющий на активность прогениторных клеток** *tweak*, **маркер макрофагов** *inos*, **ген фактора роста гепатоцитов** *hgf*, регулирующий их пролиферацию (Рис.12). В третью группу входят гены, которые реагировали на субтотальную резекцию исключительно достоверным снижением экспрессии в тот или иной период регенерации, к этим генам относятся **регуляторы ангиогенеза** *ang*, *vegf*, и **фактор миграции стромальных клеток** *sdfa* (Рис.13).

Наибольшее значение при регуляции пролиферации и регенерации печени млекопитающих HGF и TGF β . Содержание данных факторов определялось с помощью ИФА-анализа и вестерн-блота.

В печени после субтотальной резекции достоверно снижалась количество HGF (Рис.14). В оперированной печени количество HGF было меньше, чем в печени контрольных животных на 2, 3 и 7 суток после субтотальной резекции. К 10 суткам после операции содержание HGF в оперированной печени восстанавливалось (Рис.14). Несмотря на резкое снижение содержания HGF в печени после субтотальной резекции, экспрессии гена *hgf* на ранних сроках не обнаружено, а только на поздних, когда происходило восстановление содержания HGF в печени (Рис.12в, Рис .14).

При изучении содержания белка TGF β в регенерирующей печени крыс после субтотальной резекции методом вестерн-блот установлено, что TGF β практически полностью исчезал из печени после субтотальной резекции, его содержание восстанавливалось в

тканях лишь к окончанию регенерационного процесса к 7-10 суткам (Рис.15а,б). Полученные данные согласуются с исследованиями других авторов [Michalopoulos G.K., 2010]. Обращает на себя внимание совпадение периода наибольшей активности пролиферации гепатоцитов с периодом низкого содержания TGFβ в регенерирующей после субтотальной резекции печени крыс (Рис.5,7, Рис. 15а,б). Такая динамика TGFβ связана, видимо, с его функцией ингибитора пролиферации, то есть регенерация печени возможна только в условиях отсутствия в ней самой TGFβ [Fausto N., 2006, Michalopoulos G.K., 2014]. По мере завершения регенераторного процесса уровень TGFβ в печени восстанавливался (Рис.15а,б).

Большинство изученных генов, в том числе и те, у которых удалось обнаружить повышенную экспрессию, на некоторых сроках после операции экспрессировались с меньшей активностью по сравнению с контролем. Так мы обнаружили сниженную экспрессию *tweak* в период 6-24 ч, *tnfa* через 3 и 12 ч, *tgfb* и *il1b* через 12 ч, *hgf* через 24, 48 и 72 ч (Рис.11, Рис. 12). На раннем этапе регенерации это, видимо, объяснялось стрессовой реакцией печени на тяжелую травму, а на стадиях, следующих после повышенной экспрессии того или иного гена, разрушением большого количества мРНК с помощью микроРНК [Chen Y., Verfaillie C.M., 2014].

Таким образом, гены, экспрессирующиеся в печени крыс после субтотальной резекции, можно разделить на несколько групп (Рис.16). Первая группа объединяет гены, экспрессия которых достоверно повышается по сравнению с контролем в ранний период (3-48ч) регенерации печени после выполняемой операции. К этим генам относится *il6*, *il10*, *inos*, *mmp9*, *fgf2*, *tgfb*, *fn14*, *sox9*. Ко второй группе генов, экспрессия которых статистически значимо повышается на поздних сроках регенерации (5-10 сутки), относятся

il1b, *tnfa*, *tweak*, *inos*, *hgf*. В третью группу вошли гены, которые реагировали на субтотальную резекцию исключительно достоверным снижением экспрессии в тот или иной период регенерации, к этим генам на основе полученных нами данных мы отнесли *ang*, *vegf*, *sdfa*. Такая динамика активности генов-регуляторов, определяется, видимо, большим объемом резекции печени, после которой для восстановления массы требуется выраженная и длительная пролиферации гепатоцитов.

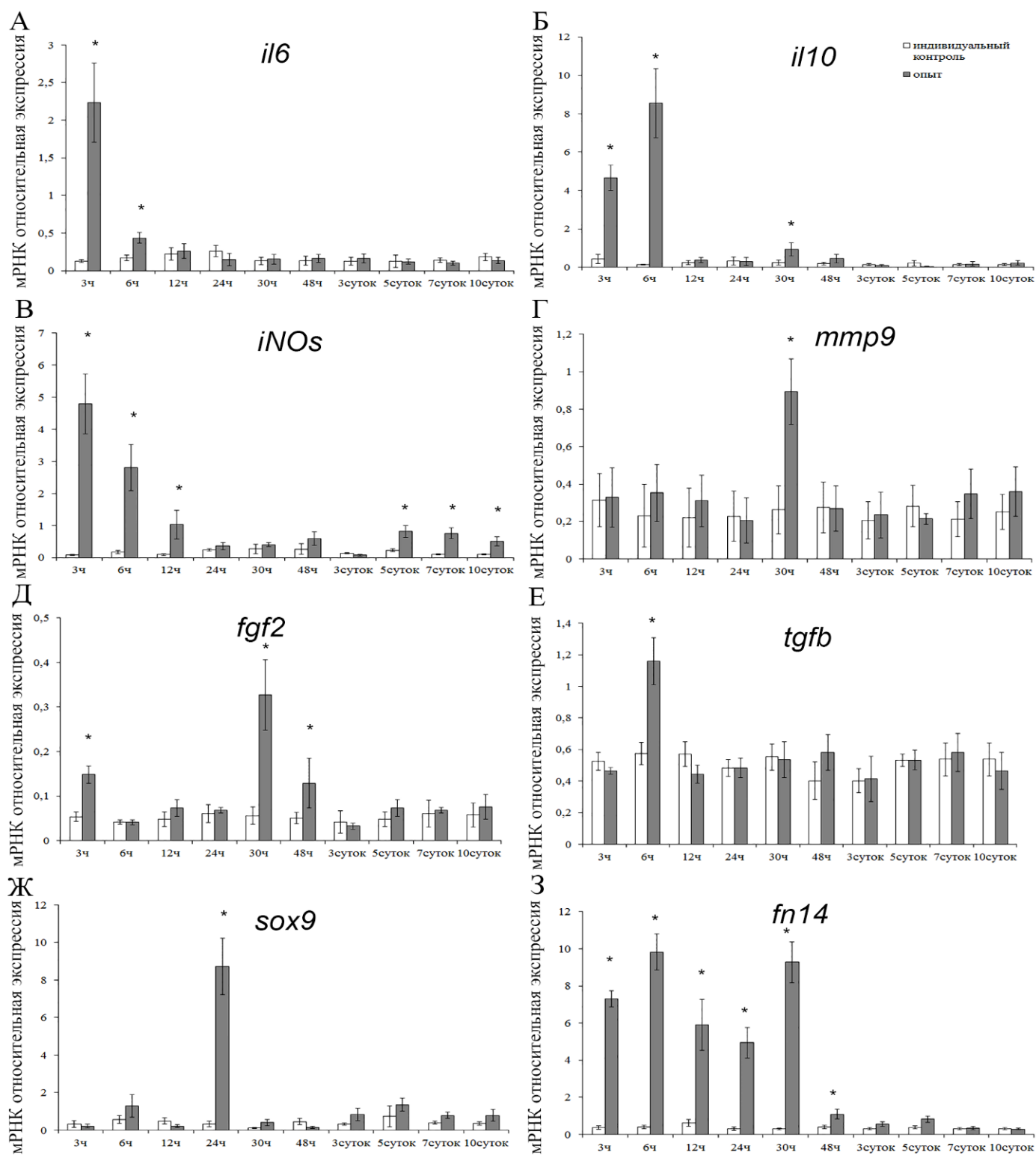


Рис.11 Экспрессия генов регуляторных молекул, активность которых была повышена через 3-48ч после субтотальной резекции. По оси абсцисс – срок после операции, по оси ординат – относительная экспрессия генов. Белые столбики – индивидуальный контроль, серые столбики – опыт, данные представлены в виде средних и доверительных интервалов, * - статистически значимые различия между оперированными и индивидуальным контролем ($p<0,05$).

В ранний период регенерации печени после субтотальной резекции статистически значимо повышается экспрессия генов *il6*, *il10*, *mmp9*, *fgf2*, *tgfb*, *inos*.

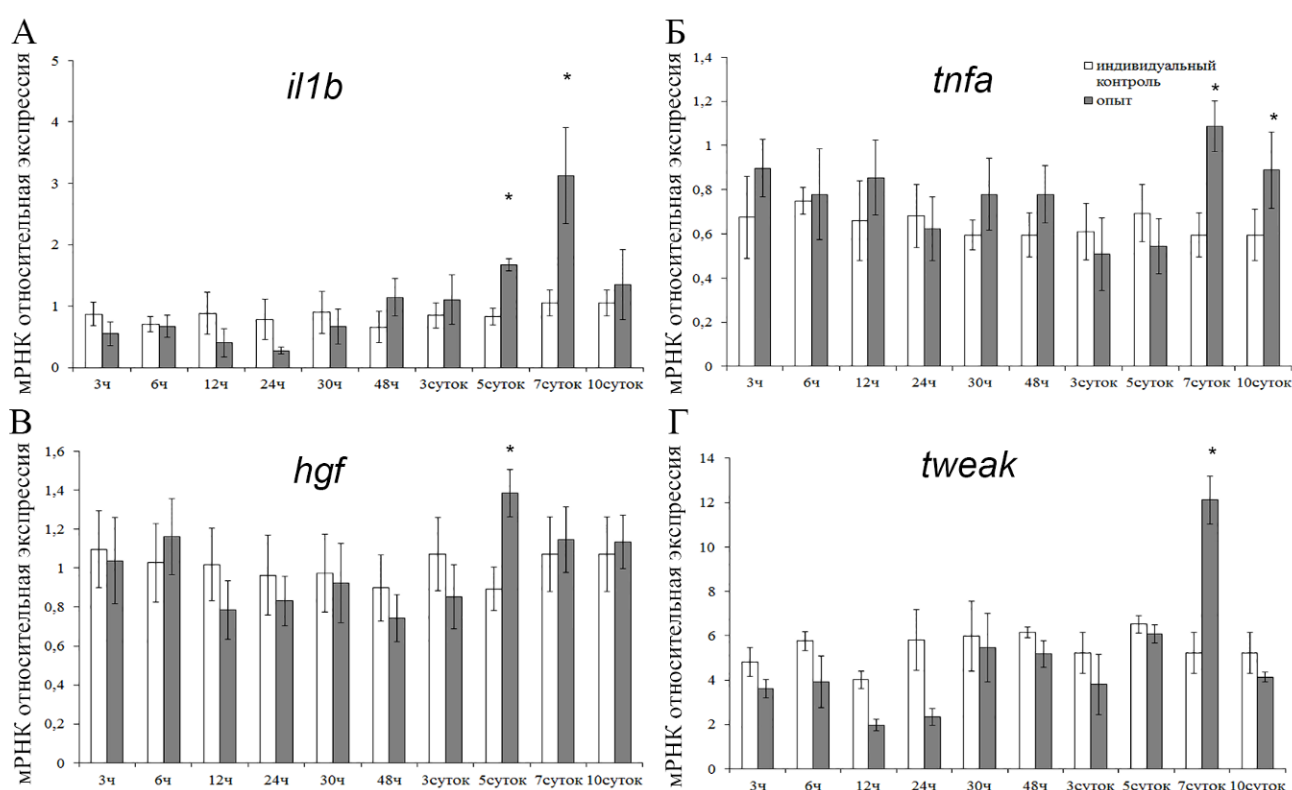


Рис.12 Экспрессия генов регуляторных молекул, активность которых была повышена через 5-10 суток после субтотальной резекции. По оси абсцисс – срок после операции, по оси ординат – относительная экспрессия генов. Белые столбики – индивидуальный контроль, серые столбики – опыт, данные представлены в виде средних и доверительных интервалов, * - статистически значимые различия между оперированными и индивидуальным контролем ($p<0,05$).

В поздний период регенерации печени после субтотальной резекции статистически значимо повышается экспрессия генов *il1b*, *tnfa*, *hgf*, *inos*.

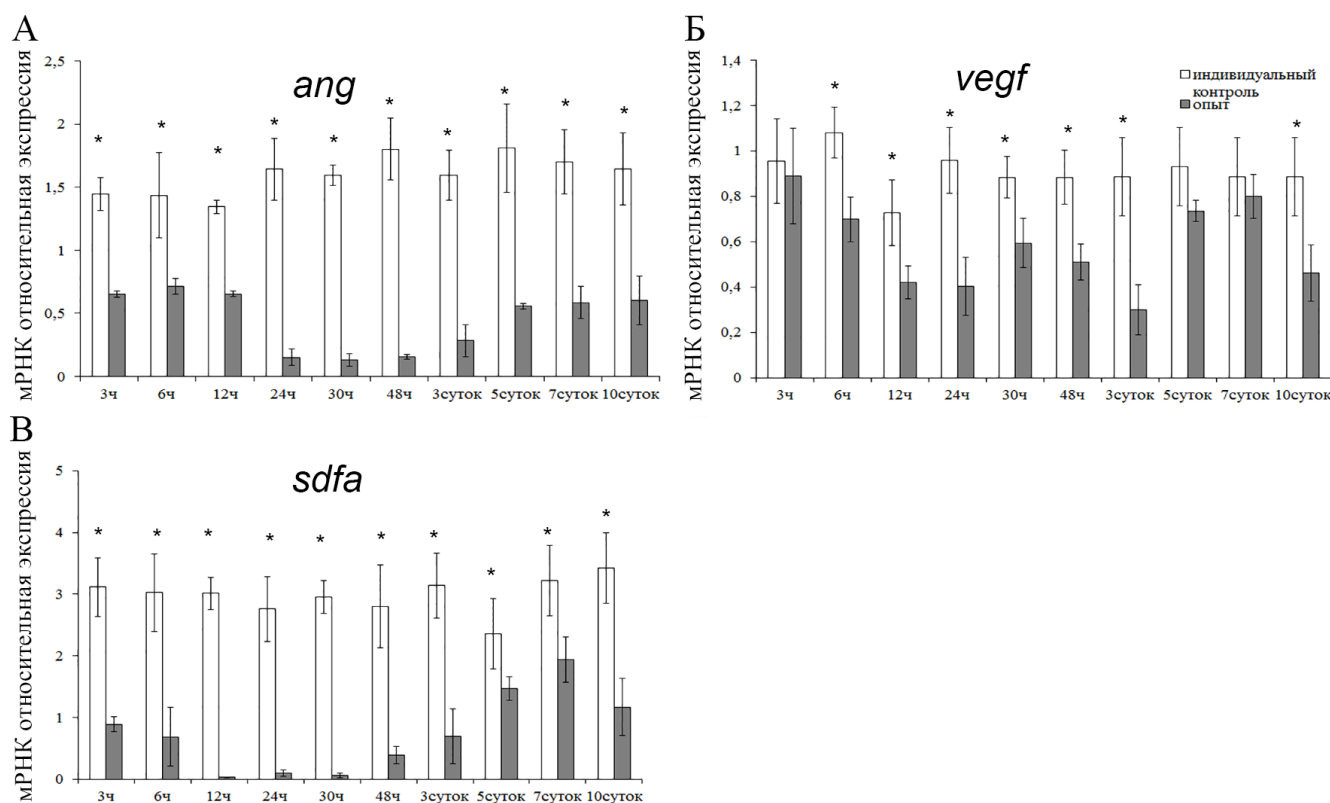


Рис.13 Экспрессия генов регуляторных молекул, активность которых была снижена после субтотальной резекции. По оси абсцисс – срок после операции, по оси ординат – относительная экспрессия генов. Белые столбики – индивидуальный контроль, серые столбики – опыт, данные представлены в виде средних и доверительных интервалов, * - статистически значимые различия между оперированными и индивидуальным контролем ($p < 0,05$).

Экспрессия генов *ang*, *vegf*, *sdfa* была статистически значимо понижена на большинстве сроков исследования.

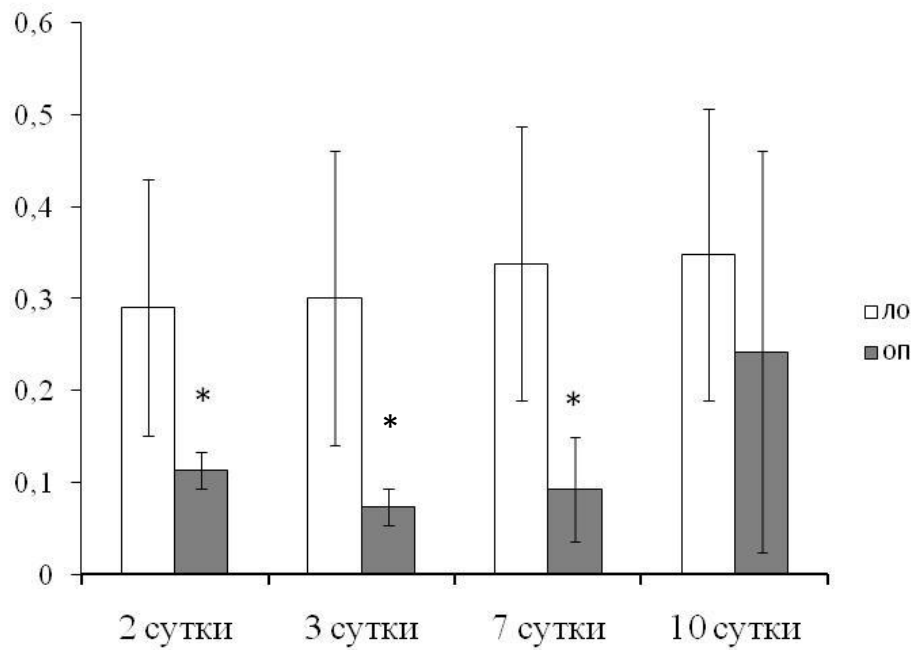


Рис. 14. ИФА белка HGF в печени крыс после субтотальной резекции. По оси абсцисс – время после операции, по оси ординат – содержание белка HGF в гомогенате печени, нормированное на общий белок. Белые столбики – ложно оперированные животные (ЛО), серые столбики – оперированные животные (ОП). Данные представлены в виде средних и доверительных интервалов.

* - статистически значимые различия между оперированными и ложно оперированными животными ($p < 0,05$).

После субтотальной резекции и последующей регенерации количества белка HGF в печени резко снижается и восстанавливается к 10 суткам после резекции.

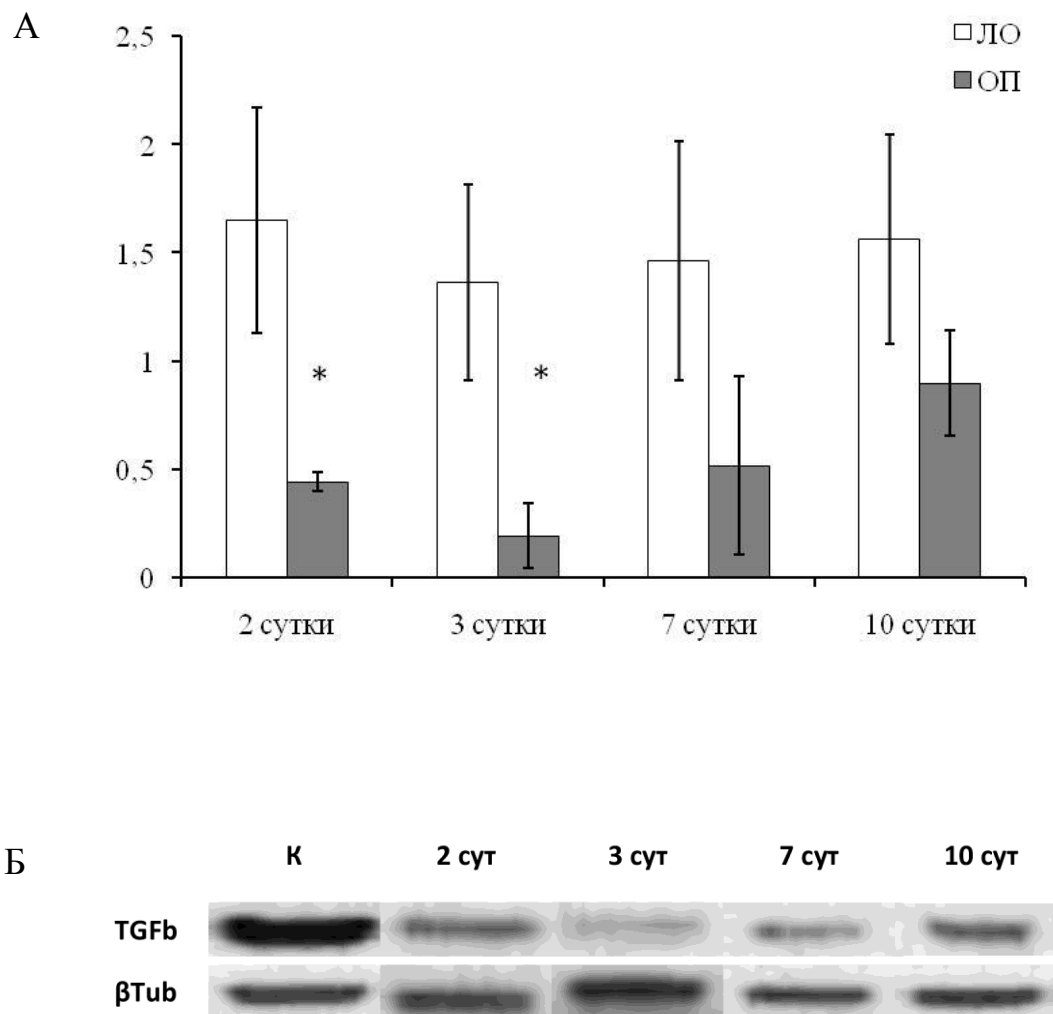


Рис. 15. Вестерн-блот белка TGFβ в печени крыс после субтотальной резекции. А. Денситометрический анализ вестерн-блота TGFβ. По оси абсцисс – время после операции, по оси ординат – относительная экспрессия белка. Белые столбики – ложно оперированные животные (ЛО), серые столбики – оперированные животные (ОП). Данные представлены в виде средних и доверительных интервалов.

Б. Вестерн-блот TGFβ.

* - статистически значимые различия между оперированными и ложно оперированными животными ($p < 0,05$).

После субтотальной резекции и последующей регенерации количества белка TGFβ в печени резко снижается и восстанавливается к 7 суткам после резекции.

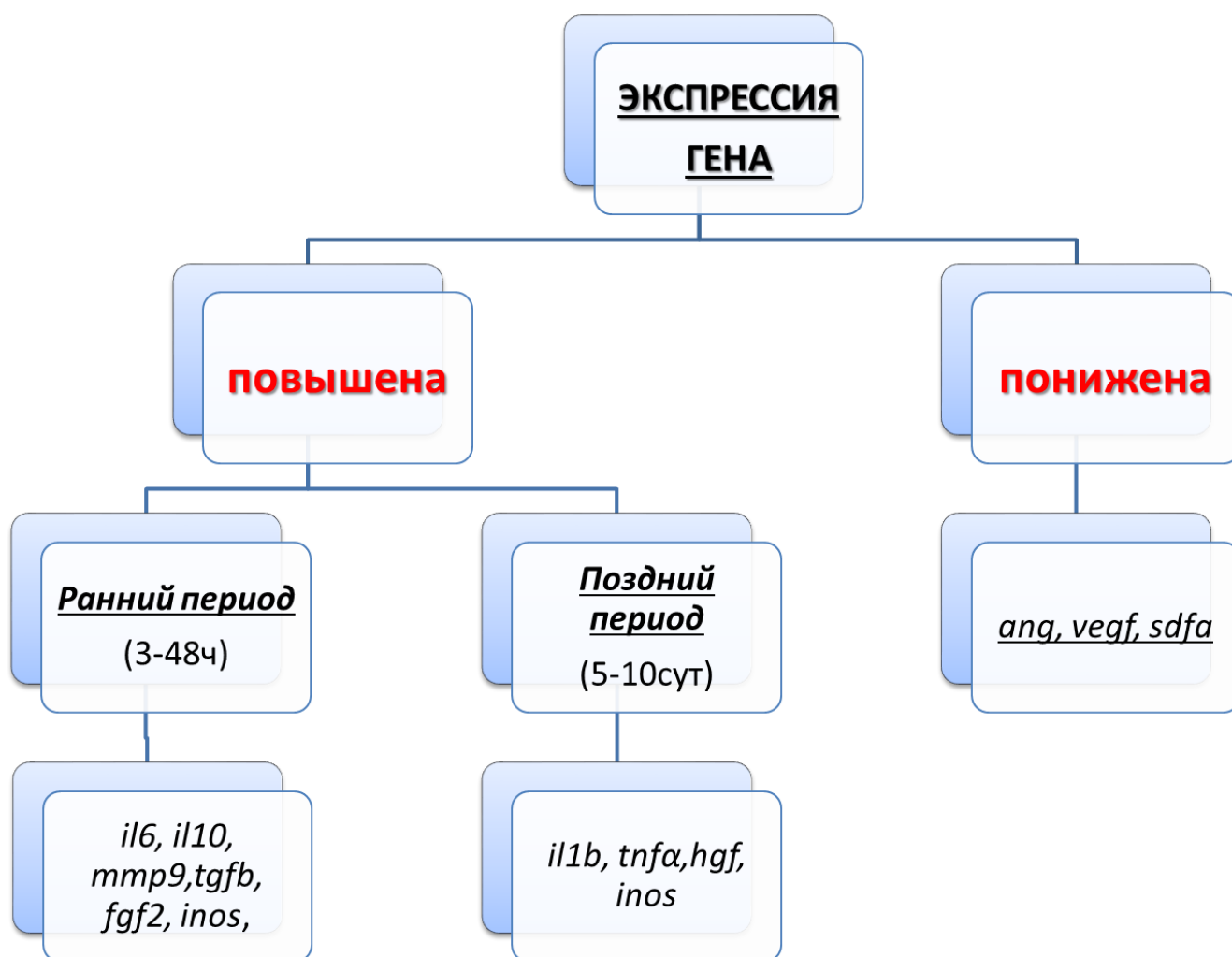


Рис. 15. Активность генов-регуляторов регенерации на протяжении восстановительного процесса в печени крыс после субтотальной резекции. Все гены разделились на две группы: с пониженной и повышенной экспрессией. Среди генов, экспрессия которых повышалась после субтотальной резекции печени крыс можно также выделить две группы: гены с повышенной экспрессией в ранний период регенерации (через 3-48ч после резекции) и гены с повышенной экспрессией в поздний период (через 5-10 суток после резекции).

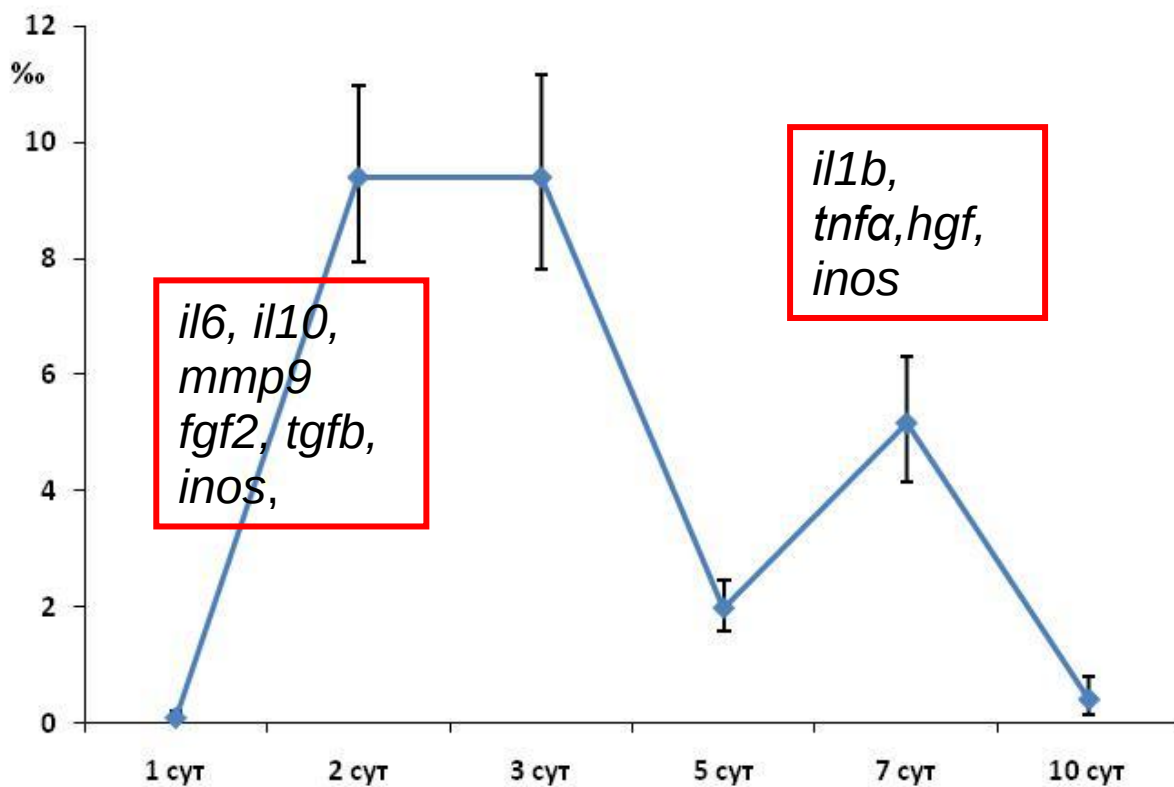


Рис. 17. Соотношение периода активной экспрессии гена с митотической активностью гепатоцитов. На две волны пролиферации гепатоцитов приходится 2 периода с повышенной экспрессией генов-регуляторов регенерации печени.

3.5 ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ-РЕГУЛЯТОРОВ РЕПАРАТИВНОГО ПРОЦЕССА ПЕЧЕНИ ПОСЛЕ СУБТОТАЛЬНОЙ РЕЗЕКЦИИ В ЛЕГКИХ И ПОЧКАХ.

Многие факторы роста, регулирующие регенерацию печени, синтезируются за ее пределами. Так EGF, который является одним из главных митогенов для гепатоцитов, синтезируется бруннеровыми железами двенадцатиперстной кишки, а также слюнными железами [Michalopoulos G.K., DeFrances M.C., 1997].

Вместе с удаляемыми тканями при субтотальной резекции печени происходит и резкое уменьшение запасов факторов роста в организме, регулирующих регенерацию печени. Исходя из этого, для восстановительного процесса могут потребоваться активные вещества внепеченочного происхождения. Так существуют единичные сообщения о повышении экспрессии *hgf* в легких, почках и селезенке во время регенерации печени после 70% резекции [Yanagita K. et al., 1992, Kono S. et al., 1992]. Данных об экспрессии цитокинов и факторов роста в легких и почках после субтотальной резекции (80% массы) отсутствуют.

В легких и почках у крыс после субтотальной резекции статистически значимо повышалась экспрессия части изучаемых нами генов. В легких через 6ч после гепатэктомии увеличивалась активность *il6*, *hgf* и *fgf2*, а через 30 ч после операции - *tnfa* (Рис.18 а,б,в,г). В почках через 6 ч после операции повышалась экспрессия генов *il6*, *il10* и *hgf* (Рис.18 д,е,ж). По данным ИФА в легких и почках крыс, у которых была произведена субтотальная резекция печени, было обнаружено увеличение количества HGF (Рис.19а,б). При этом в легких отмечено постепенное нарастание количества HGF, в почках

сначала количество HGF увеличивалось, а потом резко снижалось, что свидетельствует о выведении HGF из почек (Рис.19а,б).

В отличие от других авторов мы не обнаружили повышение экспрессии *hgf* в печени на раннем сроке регенерации после субтотальной резекции. Возможно, экспрессия гена *hgf* в легких и печени оказывает влияние на динамику синтеза данного фактора в печени. Роль факторов роста и цитокинов, синтезируемых вне печени после субтотальной гепатэктомии, зависит от объема их синтеза, от того, действуют ли они местно или секретируются в кровоток. Мы обнаружили, что в почках и легких после удаления 80% массы печени происходит повышение экспрессии *hgf*, *fgf2*, *tnfa*, *il6*, *il10*. Необходимо учитывать, что локальное повышение экспрессии этих генов в легких и почках может быть обусловлено их повреждением продуктами обмена при печеночной недостаточности, и может не влиять на регенерацию печени.

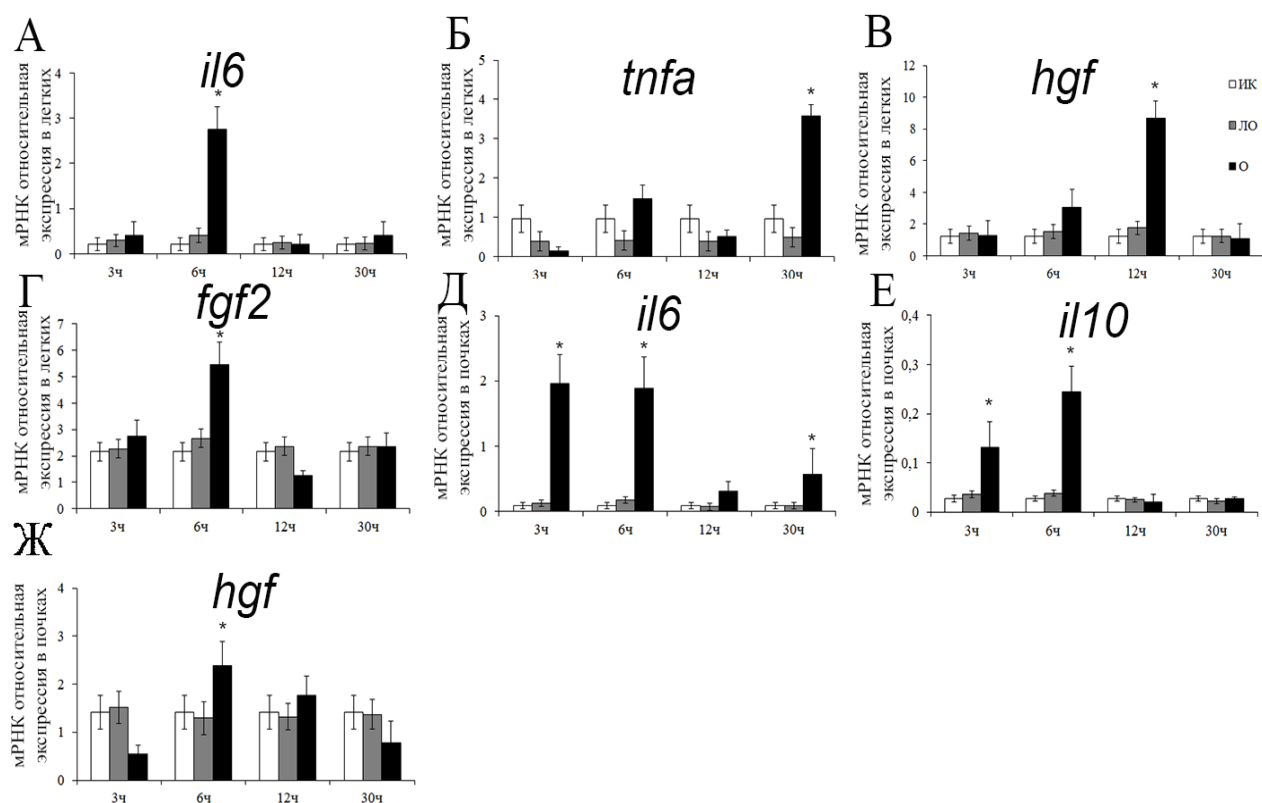


Рис. 18. Экспрессия генов сигнальных молекул в легких (А,Б,В,Г) и почках (Д,Е,Ж) после субтотальной резекции печени крыс. По оси абсцисс – срок после операции, по оси ординат – относительная экспрессия генов. Белые столбики – интактный контроль, серые столбики – ложнооперированные животные, черные – опыт, данные представлены в виде средних и доверительных интервалов, * - статистически значимые различия между оперированными и ложно оперированными животными ($p < 0,05$).

В легких крыс после субтотальной резекции обнаружено статистически значимое повышение экспрессии *il6*, *tnfa*, *hgf*, *fgf2*, а в почках - *il6*, *il10*, *hgf*.

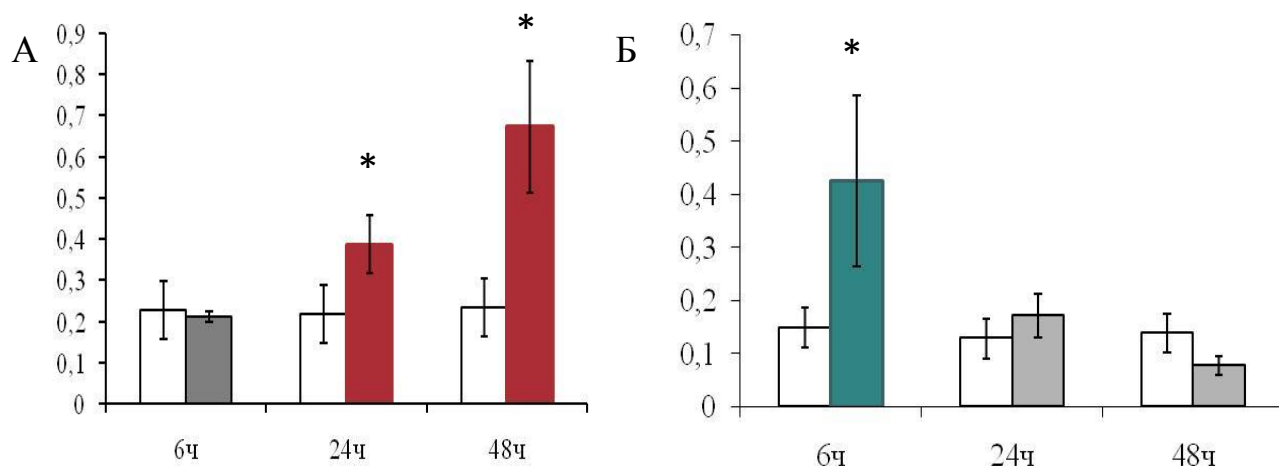


Рис 19. ИФА белка HGF в легких (А) и почках (Б) крыс после субтотальной резекции. По оси абсцисс – время после операции, по оси ординат – содержание белка HGF в гомогенате легких или почках, нормированное на общий белок. Белые столбики – ложно оперированные животные (ЛЮ), серые столбики – оперированные животные (ОП). Данные представлены в виде средних и доверительных интервалов.

* - статистически значимые различия между оперированными и ложно оперированными животными ($p < 0,05$).

3.6 ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ ПОСЛЕ СУБТОТАЛЬНОЙ РЕЗЕКЦИИ

Восстановление массы печени после 70% резекции происходит в основном за счет пролиферации гепатоцитов без участия незрелых клеток-предшественниц [Michalopoulos G.K., 2014]. Однако в настоящее время данное положение подвергается пересмотру, так как появились данные об активации прогениторных клеток, трансдифференцировки гепатоцитов в холангиоциты и наоборот даже после удаления части паренхимы печени [Furuuama K., 2011]. В общем можно сказать, что вклад альтернативных путей в регенерацию печени зависит от вида и тяжести повреждения: чем

сильнее повреждение блокирует пролиферативную способность гепатоцитов или холангиоцитов, тем выше вероятность участия прогениторных клеток в регенерации печени. Роль дополнительных путей в регенерации печени после субтотальной резекции (удаление 80% массы органа) не изучена.

Проблема изучения роли альтернативных путей в регенерации печени осложняется отсутствием специфического маркеров недифференцированных клеток в печени. Поскольку считается, что прогениторные клетки печени происходят из клеток билиарного эпителия, а также что неотъемлемым этапом трансдифференцировки гепатоцитов в холангиоциты или наоборот является увеличение количества клеток билиарного компартмента. Поэтому принято детектировать активацию альтернативных путей регенерации печени по доли холангиоцитов в печени и их маркеру цитокератину 19 - CK19.

После субтотальной резекции печени крыс на всех сроках исследования CK19 экспрессировался в эпителии желчных протоков (Рис.20а,в,д). С 2 по 5 сутки после операции доля CK19+ клеток в регенерирующей печени была статистически значимо выше по сравнению с контролем, через 7-10 суток после воздействия доля CK19+ не отличалась от контроля (Рис.21). При определении содержания белка CK19 методом вестерн-блот статистически значимых различий между контролем и опытом не выявлено (Рис.22а,б)

Другим возможным маркером малодифференцированных клеток в печени может быть SOX9 [Furuyama K., 2011]. При изучении экспрессии SOX9 в регенерирующей печени было выявлено, что у контрольных животных данный белок определяется исключительно в ядрах холангиоцитов (Рис.23а). Однако через 1 сутки после резекции

были обнаружены единичные SOX9+ гепатоциты. Наибольшее количество таких клеток выявлялось через 2 и 7 суток после субтотальной резекции печени крыс (Рис.23 б,в), за счет чего на этих сроках и увеличивался индекс SOX9+клеток (Рис.24). При определении содержания SOX9 в регенерирующей печени методом вестерн-блот было выявлено, что достоверное увеличение количества SOX9 в печени по сравнению с контролем происходило через 2 и 7 суток после операции (Рис.25 а,б).

Молекулярные механизмы, регулирующие активацию прогениторных клеток в печени или трансдифференцировку между гепатоцитами и холангиоцитами, мало изучены. Среди основных путей часто называют TWEAK- и NOTCH-сигнальный путь.

С помощью ПЦР-РВ изучили активность генов TWEAK-сигнальному пути. Обнаружено статистически значимое повышение экспрессии гена *fn14* через 0,5-48ч после резекции, а гена *tweak* через 5 и 7 суток после операции (Рис.11з, Рис. 12г). Рецептор Fn14 слабо экспрессировался в холангиоцитах и в гепатоцитах (Рис.26а). Однако через 1 сутки после субтотальной резекции печени крыс в гепатоцитах усиливалась экспрессия Fn14. Наибольшая экспрессия Fn14 отмечалась через 2-3 суток после субтотальной резекции (Рис.26б,в,г), к 7 и 10 суткам после операции активность экспрессии возвращался к контрольному уровню (Рис.26д,е). Полученные данные об интенсивной экспрессии белка Fn14 гепатоцитами, а также совпадение сроков наибольшей экспрессии Fn14 с пиком пролиферации гепатоцитов подтверждают данные о важной роли Fn14/TWEAK-сигнального пути не только в активации и пролиферации прогениторных клеток печени, но и в митотическом размножении гепатоцитов [Han S. et al., 2003, Karaca G. et al., 2014].

Пролиферация гепатоцитов при регенерации печени млекопитающих регулируется множеством факторов роста и активных молекул, что создает устойчивую систему [Michalopoulos G.K. 2011]. В случае инактивации одного регуляторного каскада включается другой, дублирующий, что позволяет запустить репаративные процессы в органе даже при тяжелых травмах. Возможно, одним из запасных регуляторных каскадов для репарации печени является Fn14/TWEAK-сигнальный путь, который активируется только в условиях сверхсильных повреждений и может регулировать как активацию прогениторных клеток, так размножение гепатоцитов.

Помимо TWEAK-сигнального в активации альтернативных путей регенерации печени млекопитающих принимает участие NOTCH-сигнальный каскад, который активирует трансдифференцировку гепатоцитов в холангиоциты [Yanger K. et al., 2013]. Сходная роль принадлежит Hippo/Yap-сигнального пути, при этом показано, что ключевой ген этого молекулярного каскада *yap* также является NOTCH-зависимым геном [Yimlamai D. et al., 2014]. Сообщения о роли NOTCH-системы в регенерации печени после резекции немногочисленны и противоречивы. Для оценки активности NOTCH-сигнального пути с ПЦР-РВ изучалась экспрессия генов *notch1*, *notch2*, *hes1*, *yap* и *sox9*.

При изучении активности генов NOTCH-сигнального пути обнаружено, что гены *notch1* и *notch2* в печени экспериментальных животных экспрессировались на более низком уровне, чем у контрольных крыс (Рис.27 а,б). Активность *notch1* у подопытных животных была ниже по сравнению с контролем через 12, 48ч, а также в период 3-10 суток после операции (Рис.27а), активность

notch2 была снижена в период 0,5 -12ч после резекции печени (Рис.27 б).

При изучении с помощью ПЦР-РВ экспрессии гена *sox9* обнаружено, что активность данного гена повышалась через 24 часа после субтотальной резекции (Рис.11ж). Также обнаружена повышенная экспрессия другого NOTCH-зависимого гена *hes1*, через 3 и 6 ч после субтотальной резекции (Рис. 27в).

Кроме классических NOTCH-зависимых генов изучалась экспрессия гена *yap*, который также является NOTCH-зависимым геном, однако еще входит в Hippo-сигналинг, регулирующий дифференцировку гепатоцитов и холангиоцитов [Yimlamai D. et al., 2014]. Через 30 мин, 7 и 10 суток после субтотальной резекции обнаружилось статистически значимое снижение активности *yap* ($p<0,05$). Повышение экспрессии гена *yap* ни на одном из сроков не выявлено (Рис.27г).

Несмотря на обнаружение экспрессии маркеров незрелых клеток в печени после субтотальной резекции нам не удалось выявить активации альтернативных путей регенерации печени (активации прогениторных клеток, трансдифференцировки гепатоцитов). Об этом свидетельствует распределение SK19+, которые локализовались исключительно в составе желчных протоков, как и у контрольных животных, а также отсутствие в тканях печени оперированных животных клеток с промежуточным между гепатоцитом и холангиоцитом фенотипом. На отсутствие трансдифференцировки гепатоцитов в холангиоциты также указывает сниженная экспрессия генов *notch1*, *notch2* и *yap1*, которые обычно активизированы при данном процессе [Yanger K. et al., 2013, Yimlamai D. et al., 2014]. Повышение экспрессии таких NOTCH-зависимых генов как *sox9* и *hes1* после субтотальной резекции в печени происходило, возможно, под влиянием других регуляторных каскадов и скорее свидетельствовало о

подготовке гепатоцитов к пролиферации. Активация TWEAK/Fn14-сигнального пути, после субтотальной резекции печени крыс скорее была связана с участие этого молекулярного каскада в регуляции пролиферации гепатоцитов и холангиоцитов [Yimlamai D. et al., 2014], а не в стимуляции прогениторных клеток.

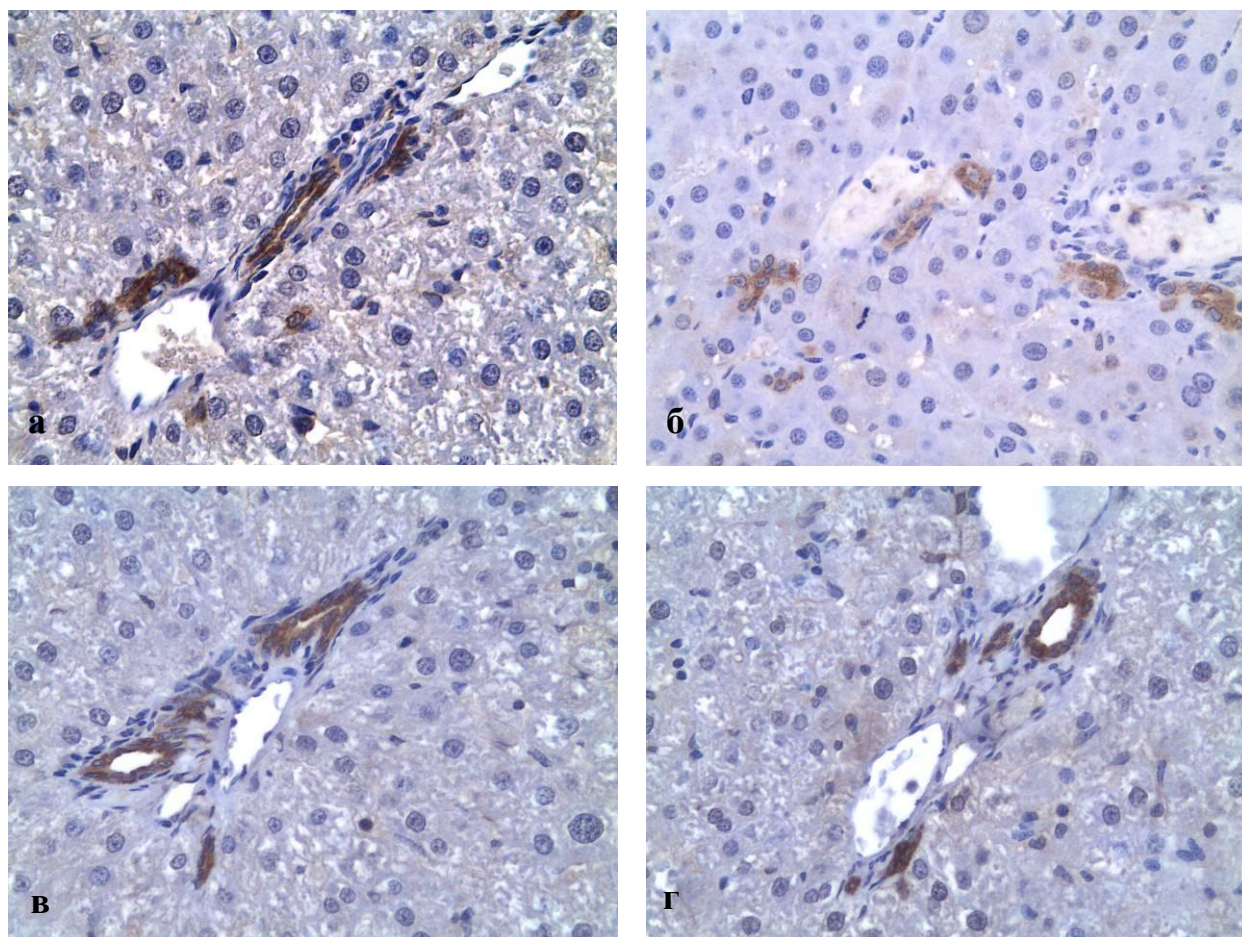


Рис.20 Экспрессия цитокератина 19 в печени крыс после субтотальной резекции, иммуногистохимическое исследование: а – интактный контроль, б – 3 сутки после субтотальной резекции, в – через 7 суток после субтотальной резекции, г – через 10 суток после субтотальной резекции, ядра докрашены гематоксилином, $\times 400$.

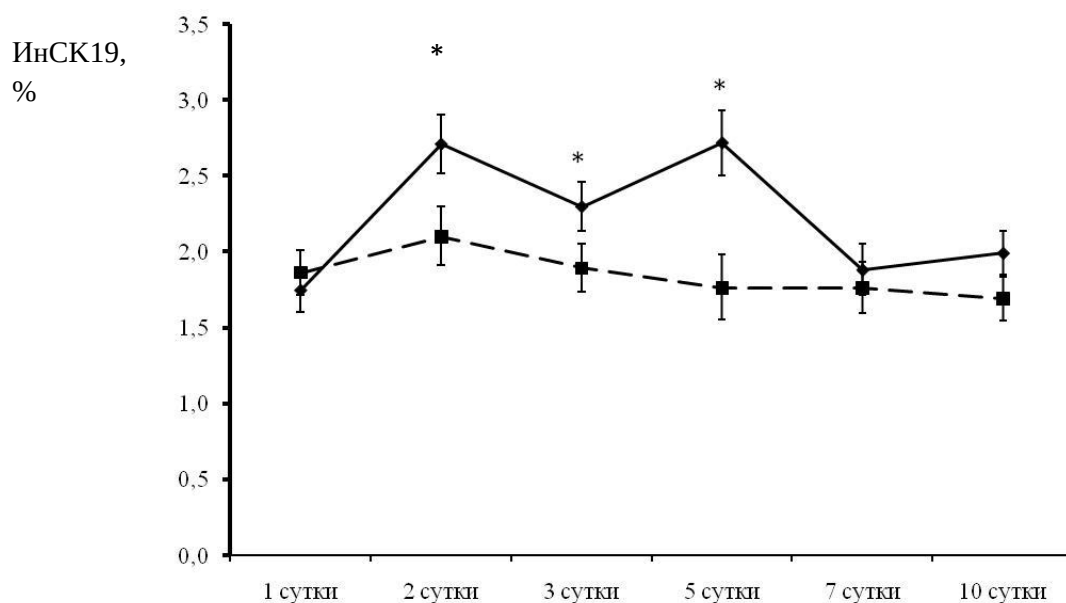


Рис.21 Динамика клеток, экспрессирующих цитокератин 19 (СК19) в печени крыс после субтотальной резекции, по оси абсцисс – срок после операции в сутках, по оси ординат – индекс СК19-позитивных клеток в %, данные представлены в виде средних значений и доверительных интервалов, непрерывная линия – оперированные животные, пунктирная линия – ложно оперированные животные, * - статистически значимые различия между оперированными и ложно оперированными животными ($p < 0,05$).

Количество СК19+ клеток в печени крыс после субтотальной резекции статистически значимо увеличивается по сравнению с контролем через 2, 3 и 5 суток после операции.

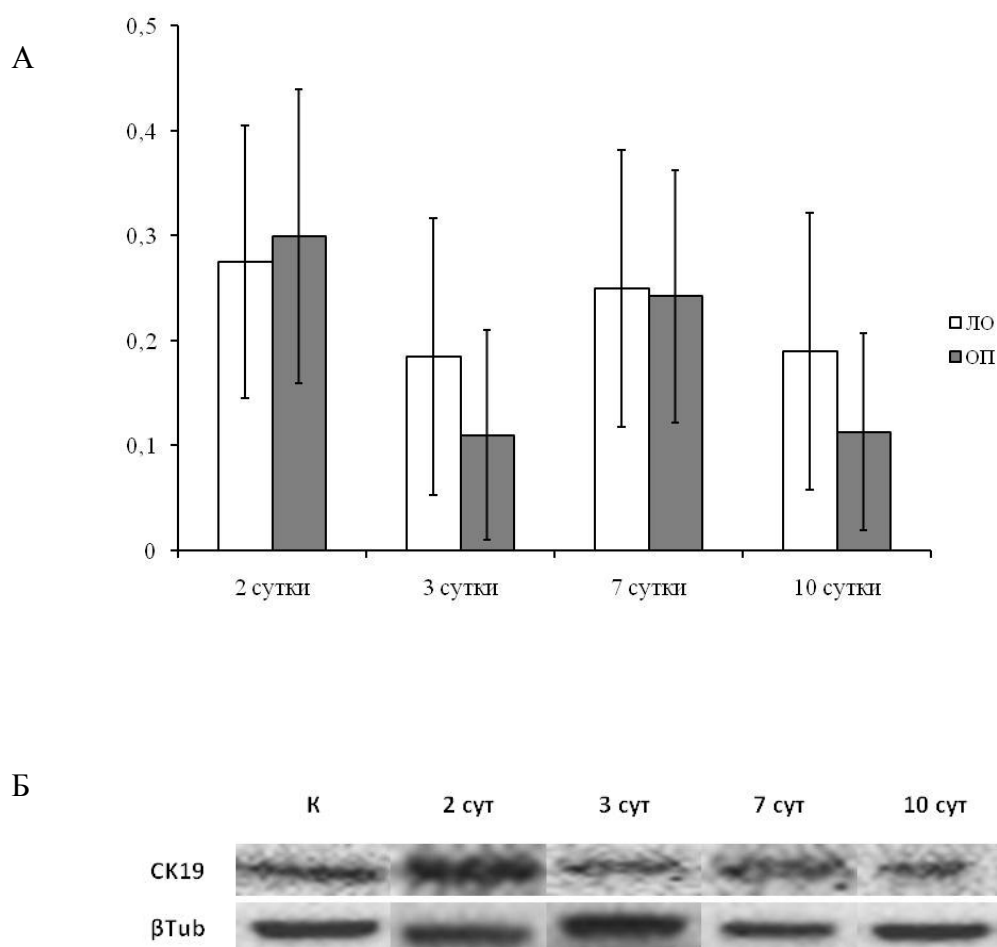


Рис.22. Вестерн-блот белка цитокератина 19 в печени крыс после субтотальной резекции. А. Денситометрический анализ вестерн-блота цитокератина 19. По оси абсцисс – время после операции, по оси ординат – относительная экспрессия белка. Белые столбики – ложно оперированные животные (ЛО), серые столбики – оперированные животные (ОП). Данные представлены в виде средних и доверительных интервалов. Б. Вестерн-блот цитокератина 19.

Статистически значимых различий не выявлено.

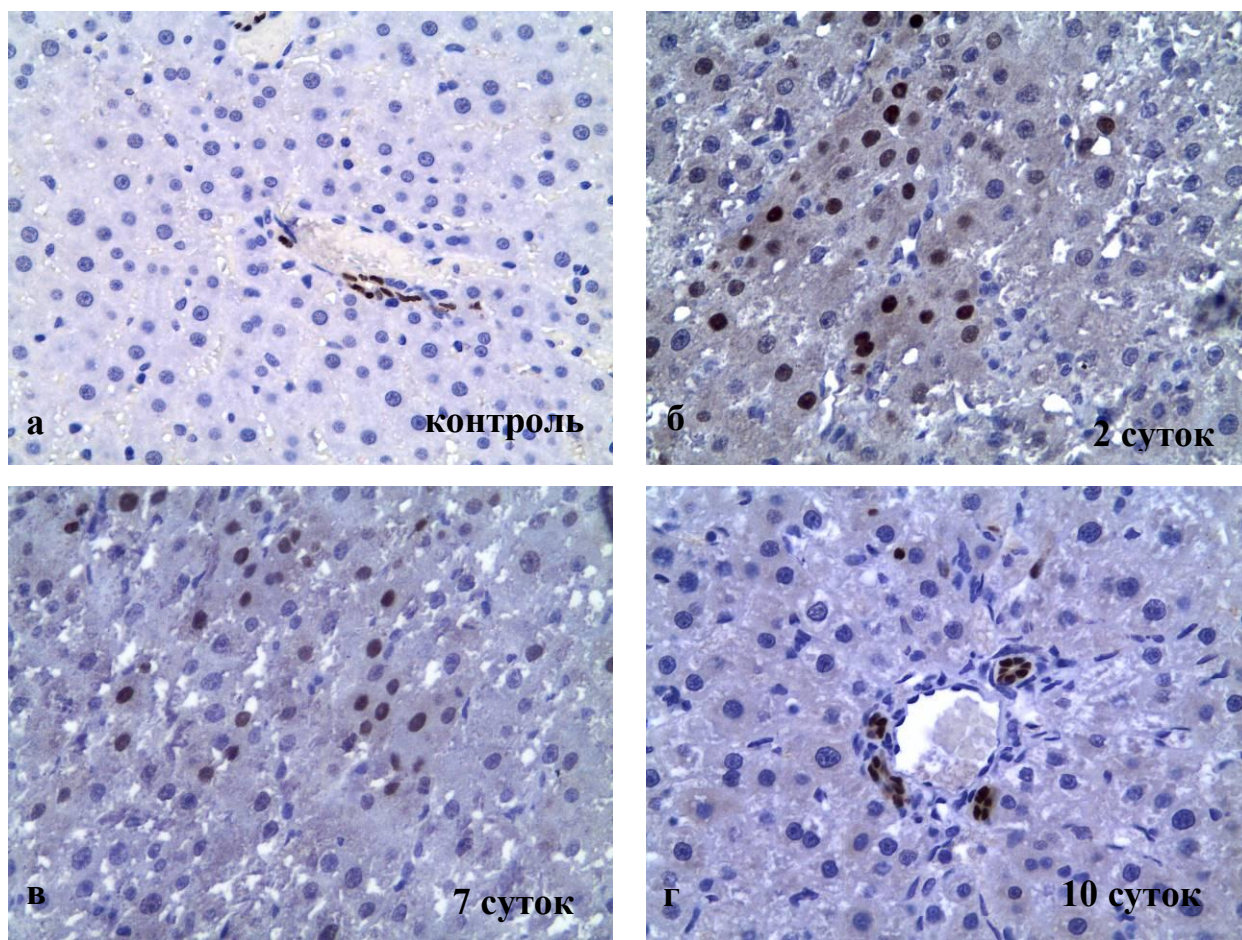


Рис.23 Экспрессия SOX9 в печени крыс после субтотальной резекции, иммуногистохимическое исследование: а – интактный контроль, б – 2 сутки после субтотальной резекции, в – через 7 суток после субтотальной резекции, г – через 10 суток после субтотальной резекции, ядра докрашены гематоксилином, $\times 400$.

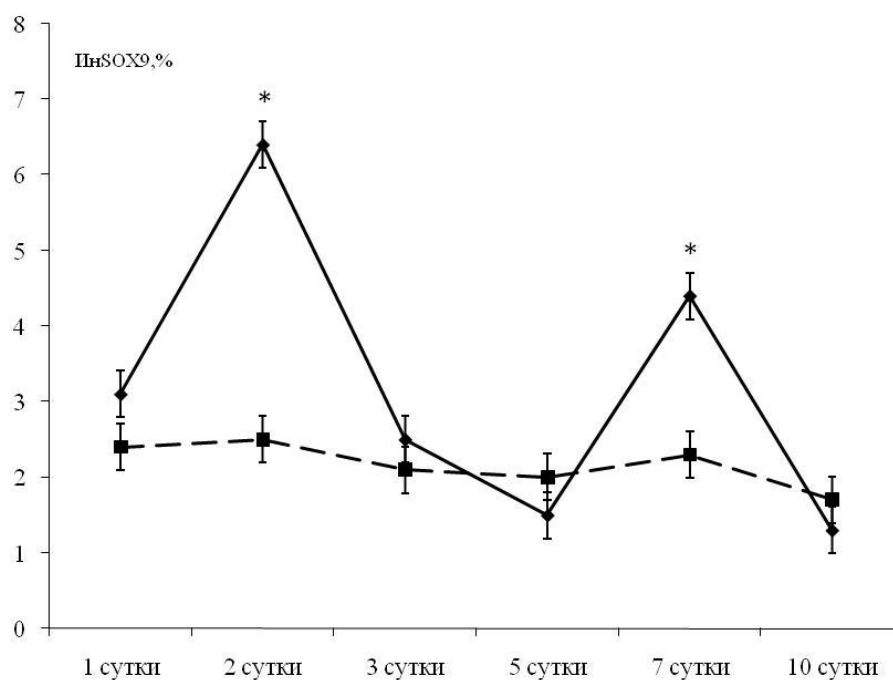


Рис.24 Динамика клеток, экспрессирующих SOX9 в печени крыс после субтотальной резекции, по оси абсцисс – срок после операции в сутках, по оси ординат – индекс SOX9-позитивных клеток в %, данные представлены в виде средних значений и доверительных интервалов, непрерывная линия – оперированные животные, пунктирная линия – ложно оперированные животные, * - статистически значимые различия между оперированными и ложно оперированными животными ($p < 0,05$).

Статистически значимое увеличение количества клеток, экспрессирующих SOX9 обнаруживали в печени крыс через 2 суток и 7 суток после субтотальной резекции, при этом в большом количестве обнаруживались SOX9+ гепатоциты.

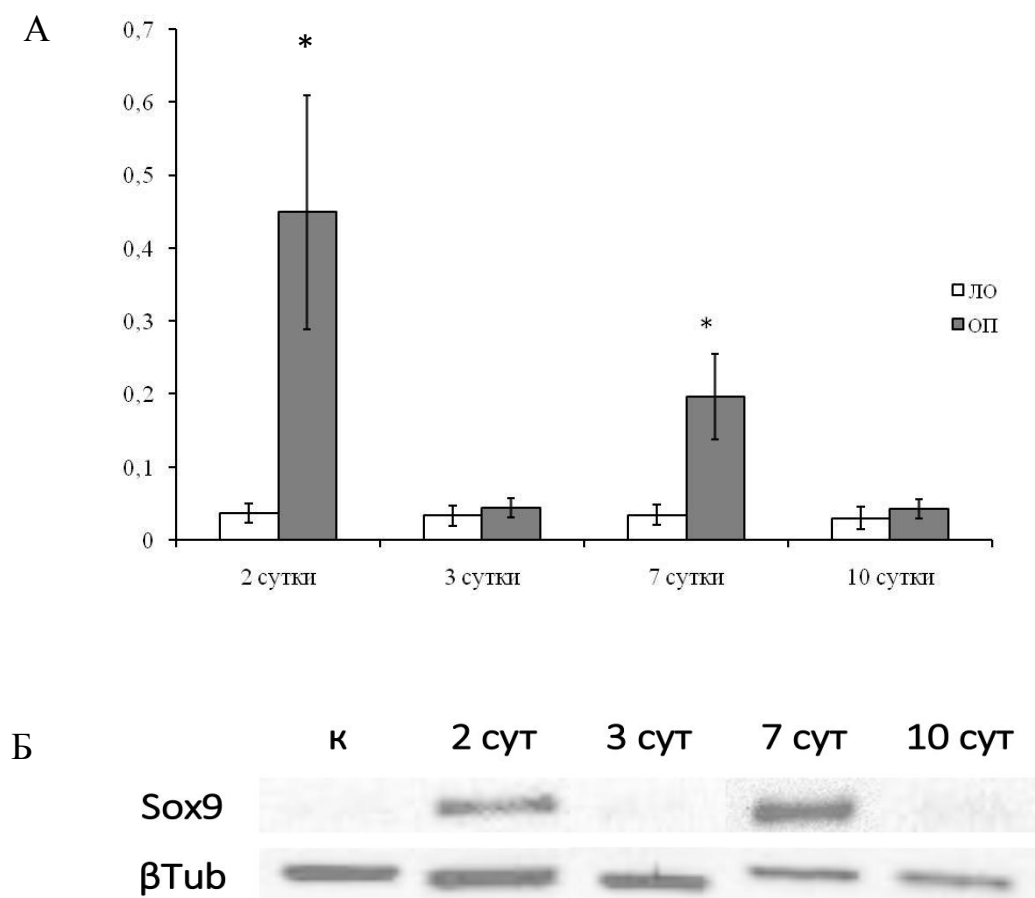


Рис. 25. Вестерн-блот белка SOX9 в печени крыс после субтотальной резекции. А. Денситометрический анализ вестерн-блота SOX9. По оси абсцисс – время после операции, по оси ординат – относительная экспрессия белка. Белые столбики – ложно оперированные животные (ЛО), серые столбики – оперированные животные (ОП). Данные представлены в виде средних и доверительных интервалов. * – статистически значимые различия между оперированными и ложно оперированными животными ($p < 0,05$). Б. Вестерн-блот белка SOX9.

Достоверное увеличение количества белка SOX9 обнаруживали в печени крыс через 2 суток и 7 суток после субтотальной резекции.

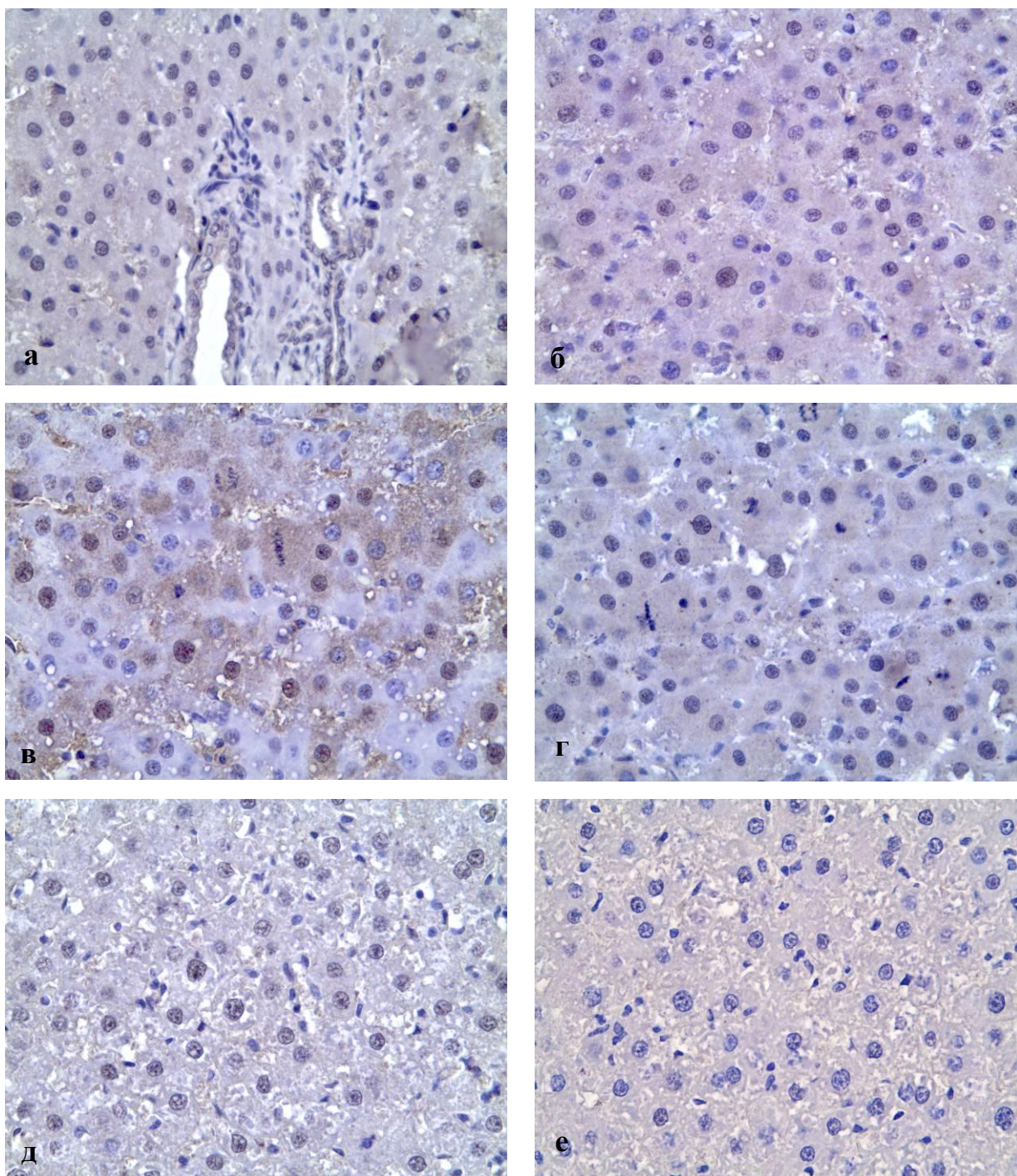


Рис.26. Экспрессия Fn14 в печени крыс после субтотальной резекции, иммуногистохимическое исследование: а – интактный контроль, б – 1 сутки после субтотальной резекции, в – через 2 суток после субтотальной резекции, г – через 3 суток после субтотальной резекции, д – через 7 суток после субтотальной резекции, е – через 10 суток после субтотальной резекции ядра докрашены гематоксилином, $\times 400$. Наибольшая экспрессия Fn14 в печени крыс после субтотальной резекции отмечалась через 2 суток после операции.

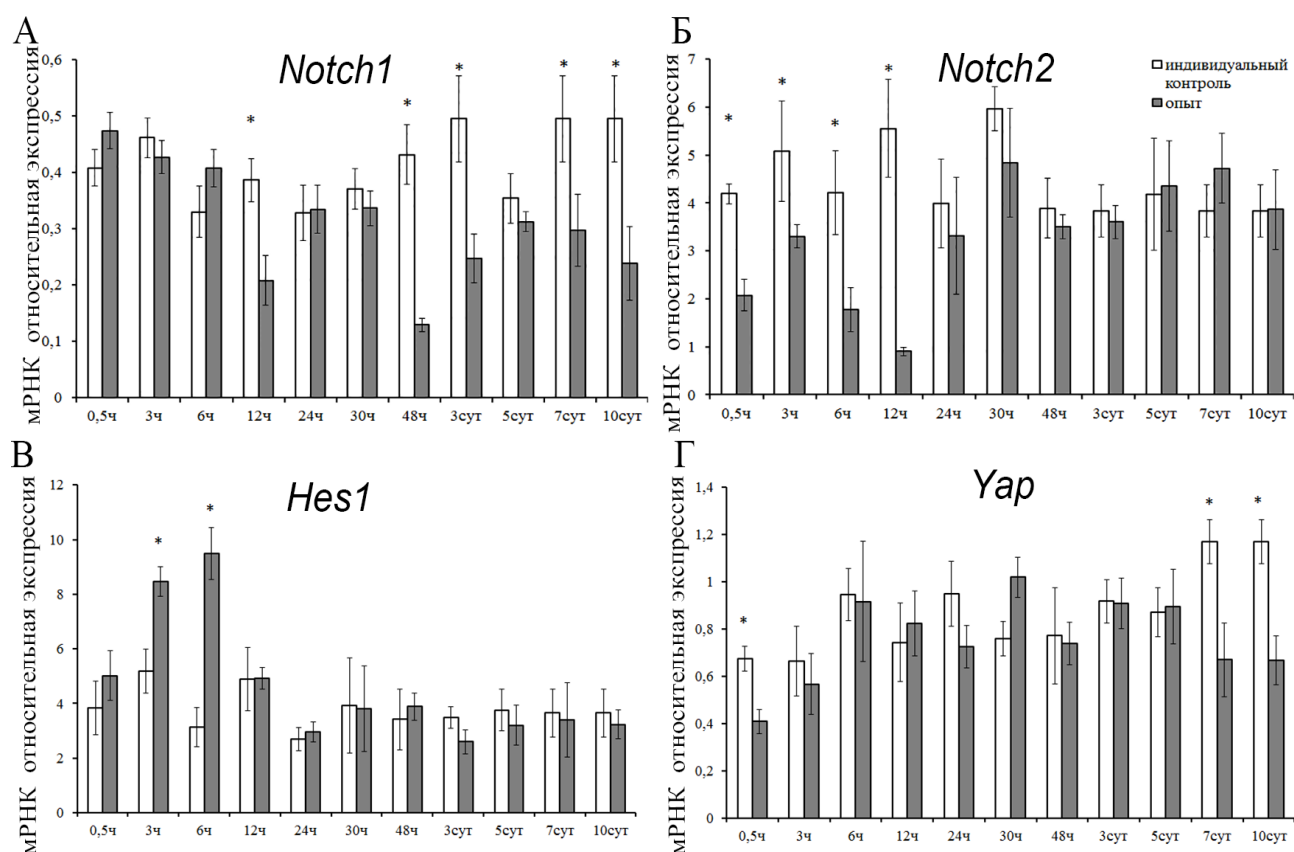


Рис.27. Экспрессия генов NOTCH-сигнального пути в печени крыс после субтотальной резекции. По оси абсцисс – срок после операции, по оси ординат – относительная экспрессия генов. Белые столбики – индивидуальный контроль, серые столбики – опыт, данные представлены в виде средних и доверительных интервалов, * – статистически значимые различия между оперированными и индивидуальным контролем ($p < 0,05$).

В печени крыс после субтотальной резекции обнаруживалось статистически значимое снижение экспрессии генов *notch1*, *notch2*, *yap1*, экспрессия *hes1* достоверно увеличивалась.

3.7 ХАРАКТЕРИСТИКА СИСТЕМЫ МАКРОФАГОВ ПЕЧЕНИ КРЫС ПОСЛЕ СУБТОТАЛЬНОЙ РЕЗЕКЦИИ

Регенерация печени млекопитающих представляет собой сложно регулируемый процесс [Michalopoulos G.K., 2014]. Одним из главных клеточных типов, организующих регенерацию печени, являются макрофаги, которые представляют собой гетерогенную популяцию клеток, различающихся по происхождению и своим свойствам [Chazaud B., 2014].

CD68+макрофаги в печени контрольных животных представляют многочисленную популяцию. Примерно 20% ядер в поле зрения принадлежало CD68+клеткам (Рис.28а). После резекции 80% паренхимы печени крыс, количество CD68+ клеток статистически значимо нарастало через 1 сут после резекции и оставалось повышенным по сравнению с контролем до 10 суток после операции включительно ($p<0,05$, Рис.28б, Рис.29а).

При этом все макрофаги относились к популяции резидентных, поскольку ни на одном из сроков после субтотальной резекции печени не обнаруживалось клеток, экспрессирующих белок CX3CR1, который является маркером макрофагов, производных моноцитов крови (Рис.30 б,в,г,д,е). Это отличает репаративный процесс в печени после резекции от восстановления после токсического повреждения с помощью CCL4, парацетамола и др., когда ткани печени инфильтрируются моноцитами крови [You Q. et al., 2013, Zigmond E. et al., 2014].

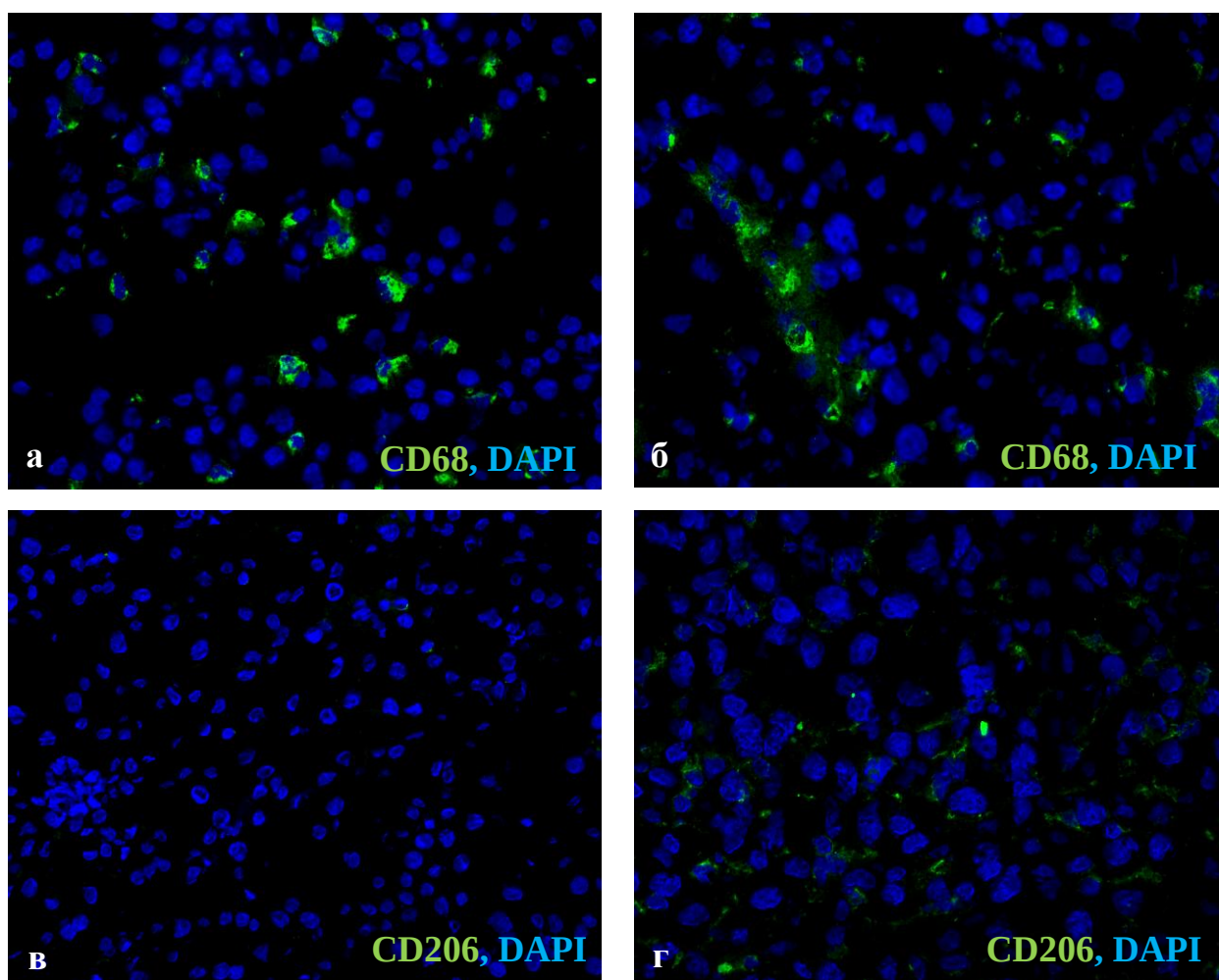


Рис.28. Динамика общего количества макрофагов (CD68+) и прорегенераторных макрофагов (CD206+) в печени крыс после субтотальной резекции. Иммуногистохимическое исследование экспрессии маркеров макрофагов: а – экспрессия CD68 в печени контрольных животных, б - экспрессия CD68 в печени подопытных крыс через 3 суток после субтотальной резекции, в – экспрессия CD206 в печени контрольных животных, г - экспрессия CD206 в печени подопытных крыс через 3 суток после субтотальной резекции, флуоресцентная микроскопия: соответствующие маркеры визуализированы с помощью вторых антител, конъюгированных с FITC – зеленое свечение, докраска ядер DAPI – синее свечение, $\times 400$

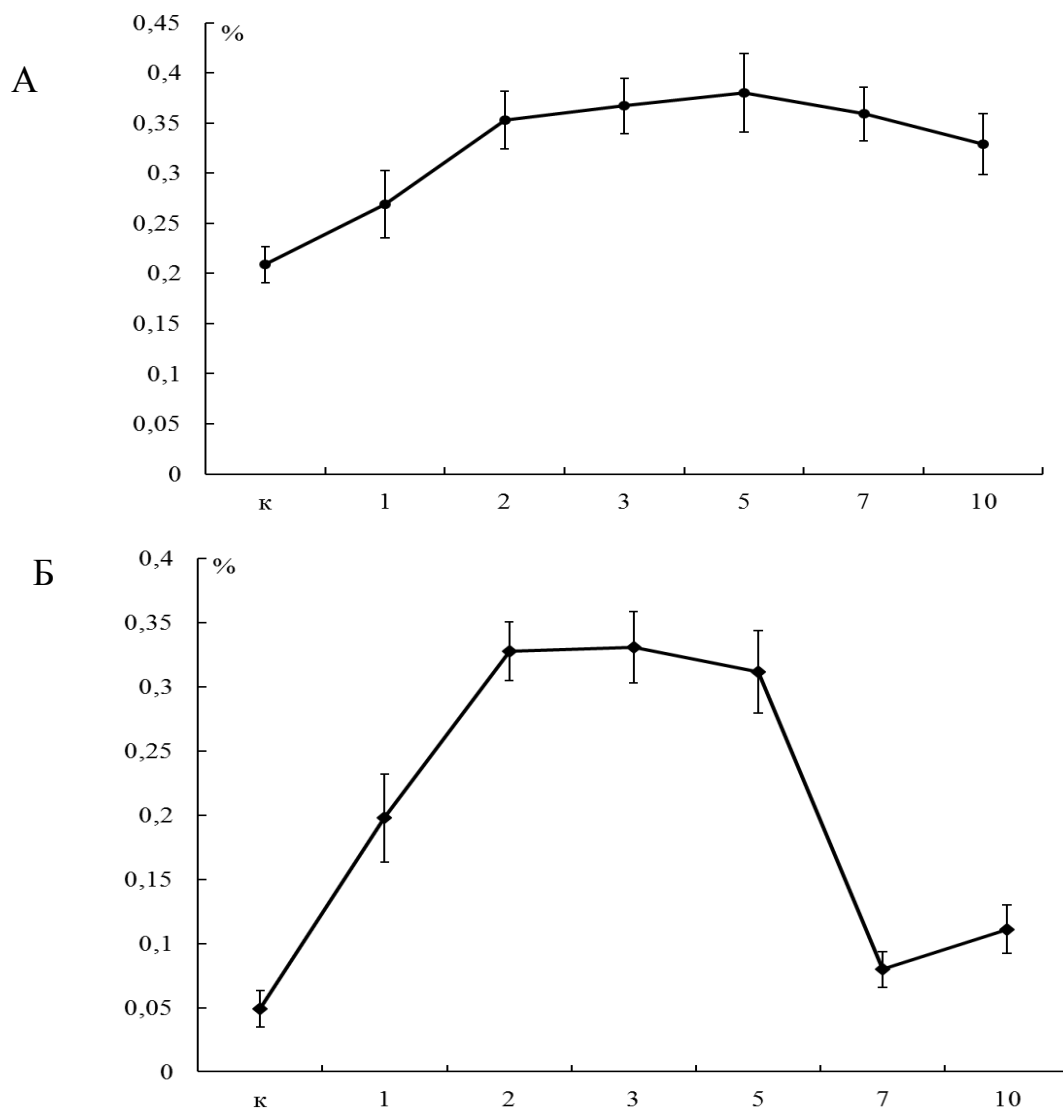


Рис.29. Динамика общего количества макрофагов (CD68+) и прорегенераторных макрофагов (CD206+) в печени крыс после субтотальной резекции. А – динамика CD68+ клеток в печени крыс после субтотальной резекции, по оси ординат доля клеток, Б – динамика CD206+ клеток в печени крыс после субтотальной резекции, по оси абсцисс - время после операции в сутках, полосы погрешности – доверительные интервалы.

После субтотальной резекции в печени крыс происходило статистически значимое увеличение количества CD68+ и CD 206+ макрофагов через 1 сутки после резекции.

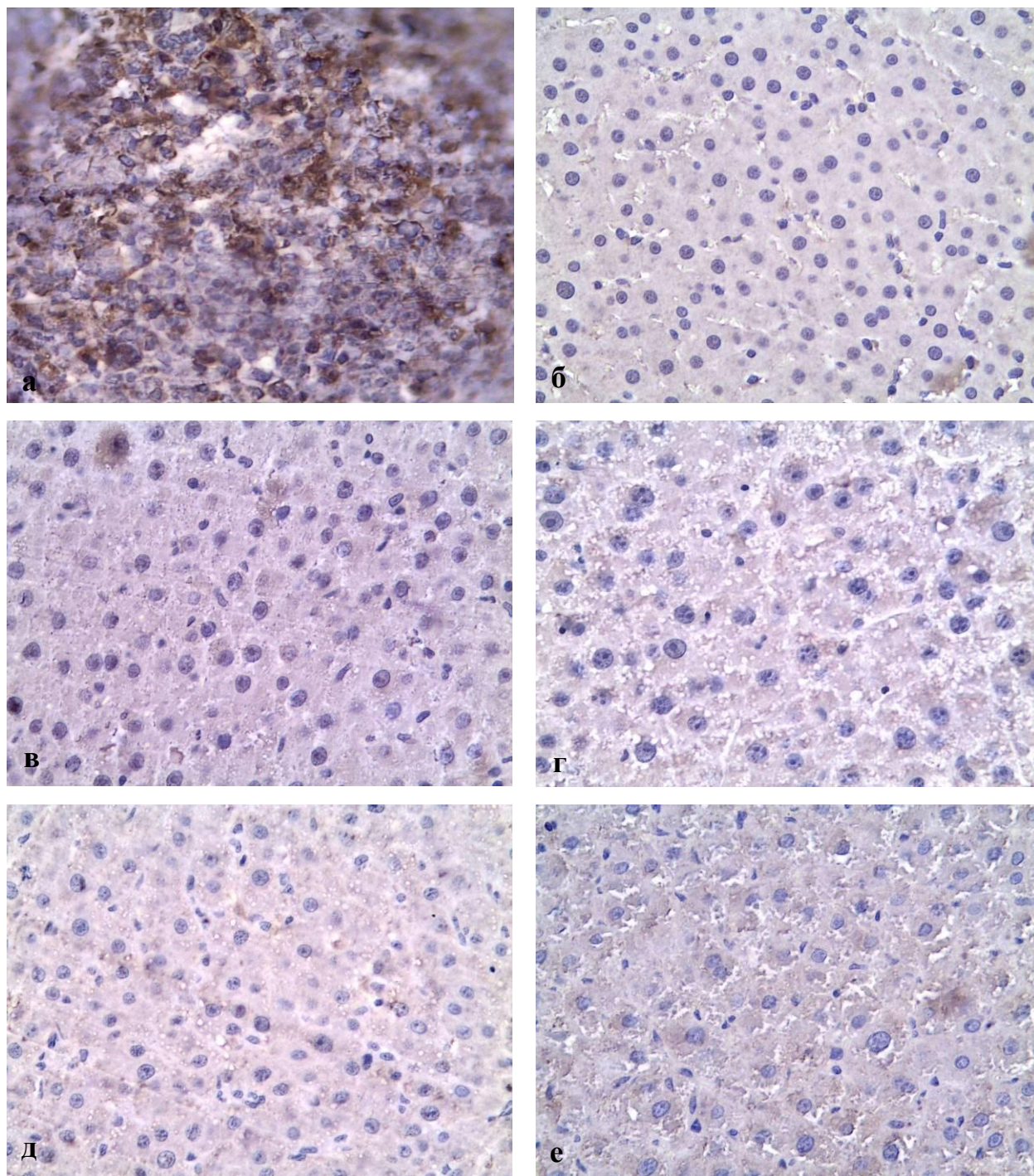


Рис. 30 Экспрессия CX3CR1 в печени крыс после субтотальной резекции а – положительный контроль, экспрессия CX3CR1 в селезенке, б – интактный контроль, в – 1 сутки после субтотальной резекции, г – через 3 суток после субтотальной резекции, д – через 7 суток после субтотальной резекции, е - через 10 суток после субтотальной резекции, ядра докрашены гематоксилином, $\times 400$.

Клеток, экспрессирующих CX3CR1 в печени крыс после субтотальной резекции не обнаружено.

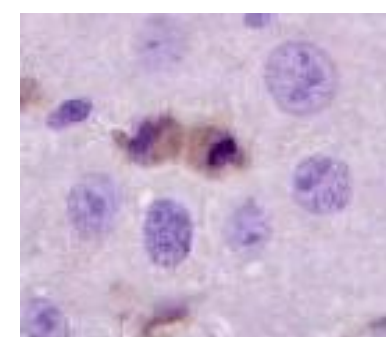
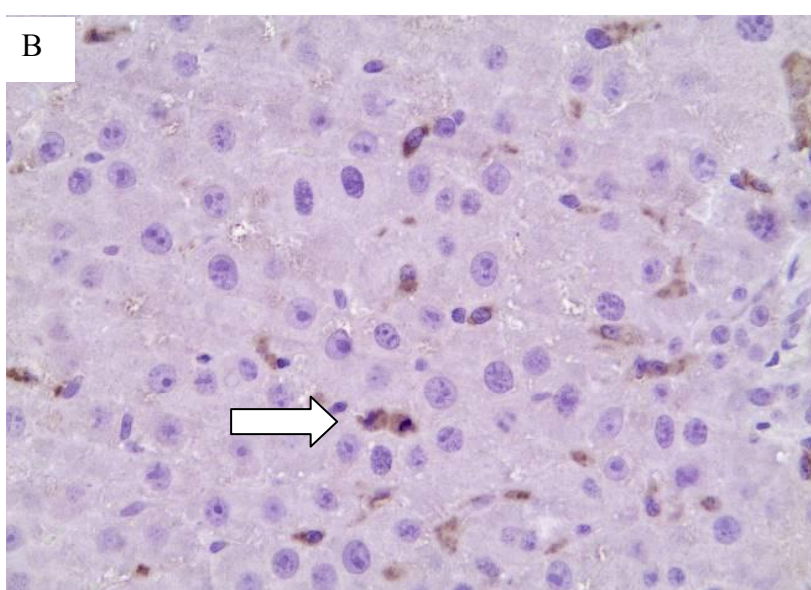
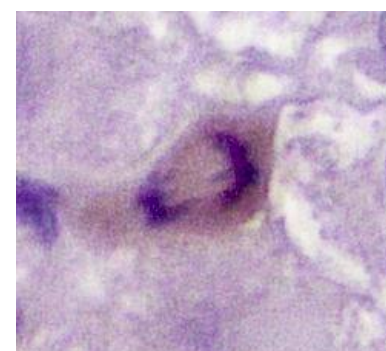
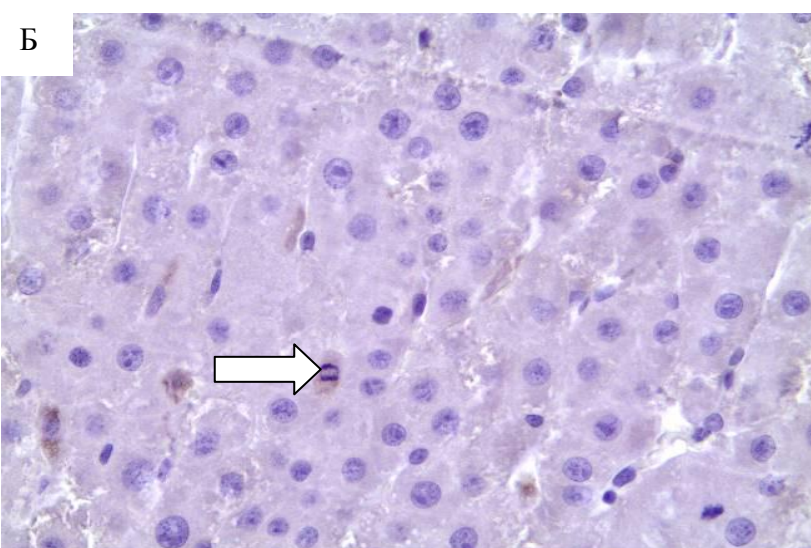
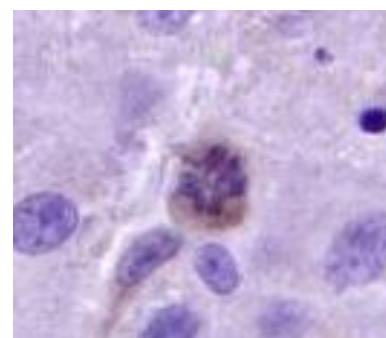
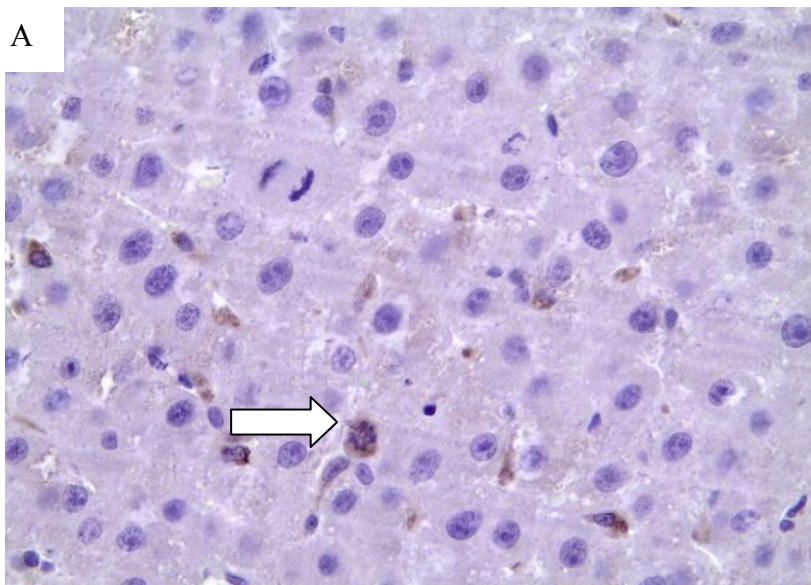


Рис.31. Митотическая активность макрофагов печени крыс через 48 ч после субтотальной резекции. А – метафаза, Б – анафаза, В – телофаза, выявление макрофагов с помощью антител к CD68, ядра докрашены гематоксилином, стрелками указаны митозы в макрофагах, $\times 400$.

Клетки, экспрессирующие белок CX3CR1 (Рис.30), который рассматривается как маркер макрофагов производных моноцитов крови [Karlmark K.R. et al., 2010, Chazaud B., 2014], в печени после субтотальной резекции отсутствовали. Учитывая это, можно предположить, что доля мигрирующих макрофагов в общей популяции макрофагов печени крыс после субтотальной резекции в отличие от токсических повреждений печени незначительна. Нарастание общего количества макрофагов в печени после субтотальной резекции у крыс можно объяснить их пролиферацией, что было подтверждено.

Митотически делящиеся макрофаги в печени крыс после субтотальной резекции обнаруживались только через 48 часов после операции (Рис.31а,б,в), митотический индекс составил $4,5 \pm 1,8\%$. Ни на более ранних сроках, ни на более поздних митозы среди макрофагов не встречались.

Гетерогенность макрофагов печени определяется не только разными источниками происхождения макрофагов, но и их функциональными различиями. M2-макрофаги в печени выявляли с помощью антител к маркеру CD206. У контрольных животных в печени среди макрофагов CD206+ клетки практически отсутствовали (Рис.28в, Рис. 29б). Однако через 1 сутки после резекции количество CD206+клеток резко возрастало (Рис.28г, Рис.29б). Обе популяции клеток (CD68+и CD206+) локализовались вблизи синусоидов печени. Наибольшее количество CD206+ макрофагов в регенерирующей печени отмечалось через 2, 3, 5 сутки после операции, а затем резко снижалось, но не достигало контрольного показателя ($p < 0,05$, Рис.29б).

Увеличение общей популяции макрофагов печени происходило через 1 сутки после субтотальной резекции, на этом же сроке отмечалось увеличение количества CD206+макрофагов (Рис.29а,б). Поскольку общее количество всех макрофагов (CD68+клетки) печени на 2-5 сутки после резекции практически не отличалось от доли CD206+макрофагов (Рис.29 а,б), то на основании полученных данных можно предположить, что в печени крыс после субтотальной резекции макрофаги, экспрессирующие CD206 (M2-макрофаги), образовывались исключительно из резидентных клеток Купфера.

Учитывая роль цитокинов в регуляции клеточного цикла гепатоцитов, одновременное повышение экспрессии генов про- и противовоспалительных цитокинов, а также нехарактерное для других органов раннее и продолжительное увеличение количества клеток, экспрессирующих маркер M2 макрофагов CD206, можно предположить, что в печени отсутствует поляризация макрофагов по этапам репаративного процесса.

Субтотальная резекция печени крыс вызывает изменение состояния общей популяции макрофагов печени, это выражается в активации экспрессии генов ряда цитокинов, а также в увеличении общего количества макрофагов в печени и в появлении среди них субпопуляции клеток, экспрессирующей CD206. При регенерации печени источником образования так называемых прорегенераторных макрофагов, экспрессирующих CD206, вероятно, являются исключительно резидентные макрофаги печени – клетки Купфера. Кроме того, динамика экспрессии генов цитокинов, а также количества CD206+клеток указывает на то, что при регенерации печени не наблюдается поляризация макрофагов, что связано ранним началом пролиферации гепатоцитов на фоне отсутствия альтеративной фазы воспаления.

3.8 СТИМУЛЯЦИЯ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ КРЫС ПОСЛЕ СУБТОТАЛЬНОЙ РЕЗЕКЦИИ С ПОМОЩЬЮ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТРОМАЛНЫХ КЛЕТОК (МСК) ПУПОЧНОГО КАНАТИКА

В предыдущих разделах были освещены основные молекулярные и клеточные механизмы регенерации печени крыс после субтотальной резекции. Обнаружено, что репаративные процессы в печени в ранний период после субтотальной резекции нарушены за счет дезорганизации пролиферации гепатоцитов. Известно, что при различных повреждениях в печени мигрируют стромальные клетки-предшественницы из красного костного мозга, селезенки и других органов. Механизмы стимулирующего влияния стромальных клеток на репаративные процессы в печени мало изучены. В данном разделе приводятся данные о влиянии МСК пупочного канатика на ключевые механизмы регенерации печени на модели восстановления массы печени после субтотальной резекции.

3.8.1. Характеристика иммунофенотипа и функциональных свойств МСК пупочного канатика лабораторных животных

В 2006 году Комитетом по Мезенхимальным и Тканевым Стволовым Клеткам (Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the ISCT) был опубликован перечень свойств истинных мультипотентных стромальных клеток (МСК) [Dominici M. et al., 2006]: адгезия к пластику, экспрессия специфических поверхностных маркеров, способность к дифференцировке по меньшей мере в одном из трех мезенхимальных направлений.

Культуры МСК пупочного канатика крысы получали в соответствии с разработанным Протоколом изолирования, экспансии и хранения МСК, выделенных из пупочного канатика. Данный Протокол не предполагает использования дополнительного покрытия пластиковой подложки культуральной посуды в процессе получения первичной культуры МСК пупочного канатика крысы или во время ее экспансии.

Для решения второй задачи целесообразно использование метода проточной цитофлуорометрии для характеристики полученных культур МСК пупочного канатика. Этот удобный и точный метод позволяет качественно и количественно определить состав поверхностных антигенов культуры клеток. Среди наиболее часто цитируемых следующие поверхностные маркеры [Dominici M. et al., 2006, Harting M. et al., 2008]:

А) Позитивные: CD73 – 5'-нуклеотидаза, CD90 (Thy-1) - поверхностный белок, представитель семейства иммуноглобулинов, CD105 - мембранный гликопротеин.

Б) Негативные: CD34, CD45, CD11b, CD19 – поверхностные белки, имеющиеся на ранних и зрелых гематopoэтических клетках.

Для МСК из различных источников (эмбриональных, постнатальных, тканей взрослого организма) показана способность дифференцировки в клетки всех трех типов зародышевых листков: эндодермального, мезодермального и эктодермального происхождения [Hass R. et al, 2011]. Для осуществления дифференцировки используют разные наборы индукторов в зависимости от источника МСК [Vater C. et al., 2011]. Приготовление дифференцировочных сред возможно в условиях собственной лаборатории исследователя, однако более удобно и близко к стандартизации процесса использование готовые наборы для дифференцировки, предлагаемых биотехнологическими компаниями.

Для подтверждения ответа клеточной культуры на действие индукторов используют самые разнообразные методы, однако до сих пор наиболее распространенными являются гистохимические и иммуногистохимические методы. Для верификации адипогенеза используются красители липидных включений (например, Oil Red O, Судан III) и антитела к адипонектину; для выявления остеогенеза – красители, образующие лаки с кальцификатами (ализариновый красный) а также антитела к щелочной фосфатазе, остеонектину, остеокальцину, остепонтину; для подтверждения хондогенеза

– красители мукополисахаридов (альциановый синий, сафранин О) и антитела к коллагену II типа и агрекану.

Результаты иммунофенотипирования представлены на Рис.32а,б,в,г,д.

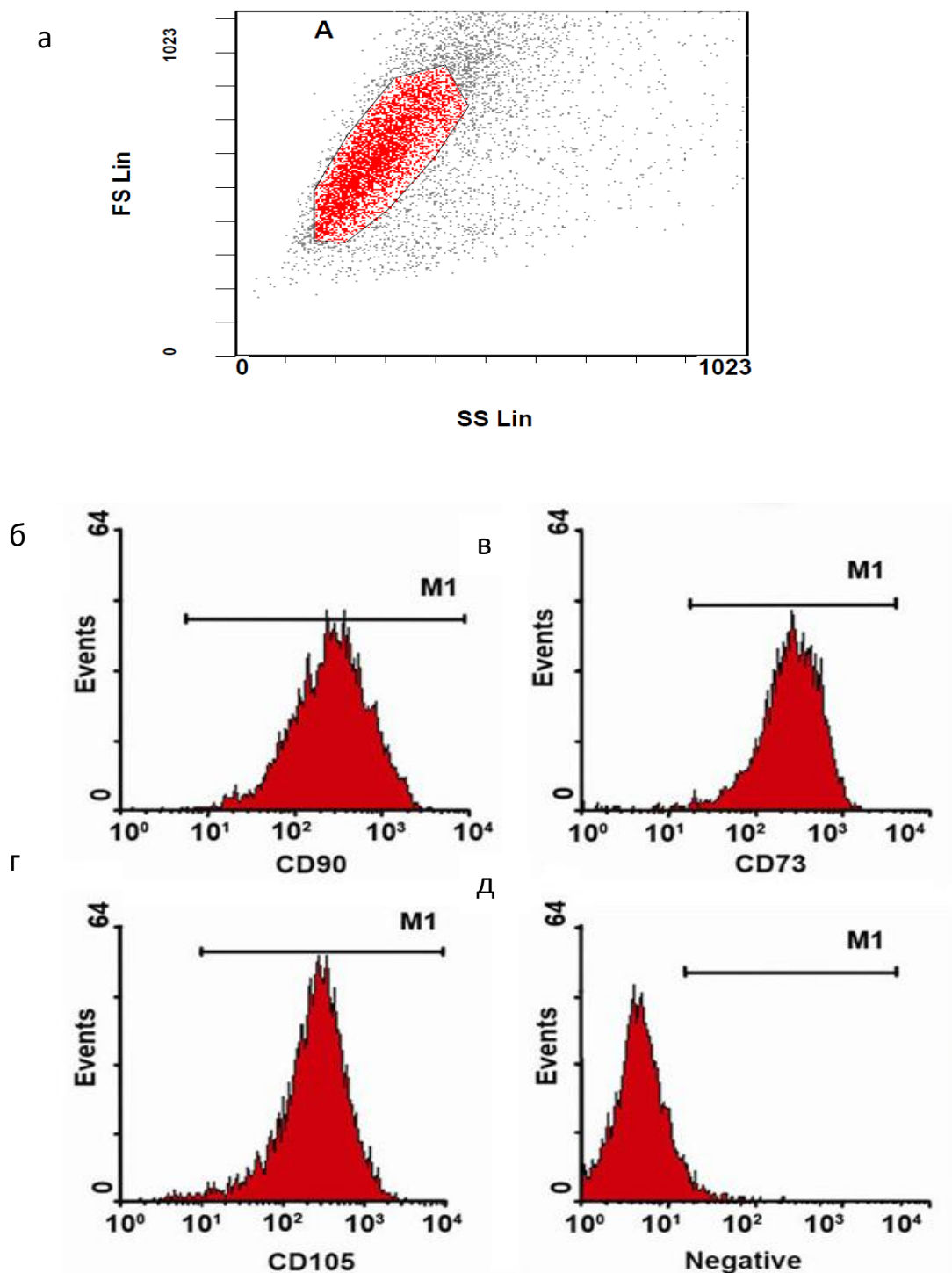


Рис.32 Фенотипирование МСК пупочного кантика: а - гейт, б - CD90-FITC, в — CD73-APC, г - CD105-Cy5.5, д - Negative cocktail (CD45, CD34,

CD11b, CD19). По своим иммунофенотипическим характеристикам выделенные нами из пупочного канатика клетки соответствовали МСК.

В ходе эксперимента был определен иммунофенотип 4-х культур пупочного канатика крыс (Таблица 4).

Таблица 4. Результаты иммунофенотипирования культур МСК пупочного канатика крыс.

	МСК ПК, 3 пассаж n=4
CD73	100%
CD90	99,8±0,2%
CD105	96,6±2,8%
Негативные	3,6±1,2%

Дифференцировочный потенциал. Контроль

В контрольной группе (без добавления среды для дифференцировки) культуры МСК пупочного канатика крысы не подвергались спонтанной дифференцировке и не изменяли характерную морфологию (Рис. 33а).

Адипогенная дифференцировка

Через неделю после начала дифференцировки (среда StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit) в клетках наблюдали образование липидных вакуолей (Рис. 33б).

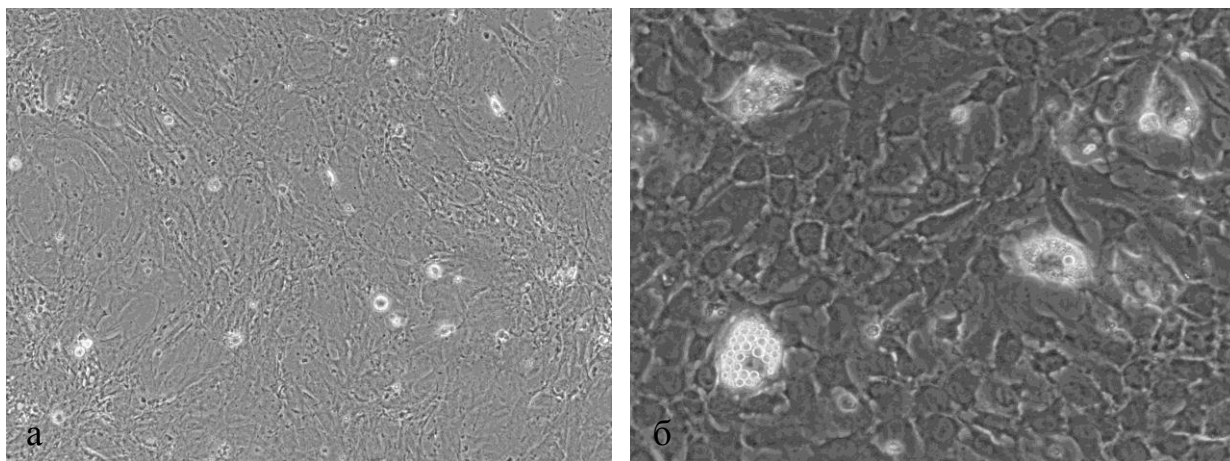


Рис. 33. А.Культивирование МСК пупочного канатика крыс в ростовой среде без добавления дифференцировочной среды. 3 пассаж. Фазово-контрастная микроскопия, х100. Спонтанная дифференцировка отсутствует.

Б.Появление липидных вакуолей в цитоплазме МСК пупочного канатика крысы под действием дифференцировочной среды. Фазово-контрастная микроскопия, х400.

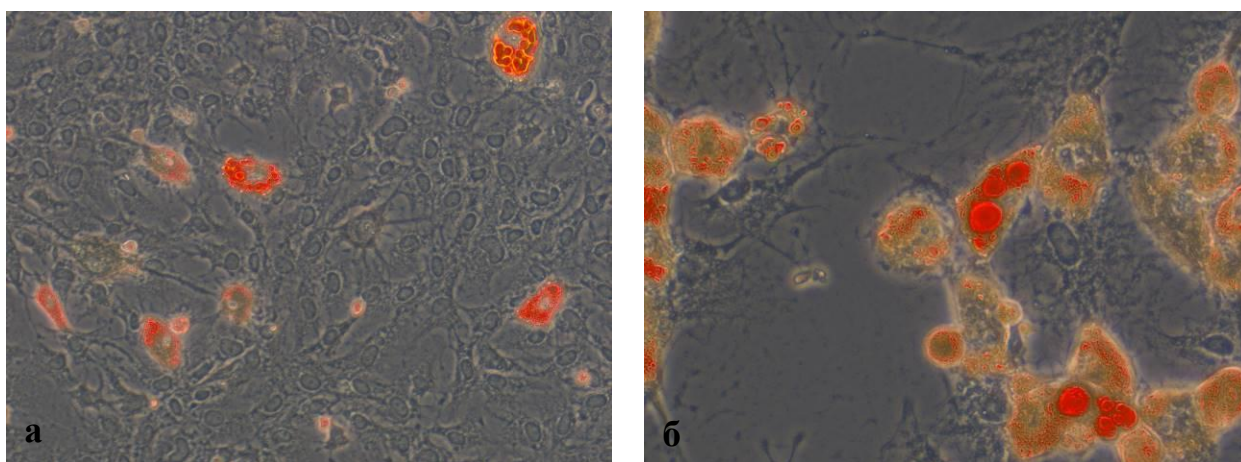


Рис. 34. Адипогенез в культуре МСК пупочного канатика под действием дифференцировочной среды. а – 7 сутки, х200, в – 10 сутки индукции, х400. Окрашивание Oil Red O.

Остеогенная дифференцировка

Признаки остеогенеза наблюдали не ранее, чем через 21 день после начала дифференцировки. Клетки формировали особые конгломераты, которые окрашивались ализариновым красным – красителем, образующим в слабокислой среде лаки при взаимодействии с отложениями кальция (Рис.35а).

Хондрогенная дифференцировка

После 3-4-х недель инкубации в дифференцировочной среде обнаруживали формирование узелков правильной формы. Эти узелки окрашивались альциановым синим, что указывает на накопление в них мукополисахаридов (Рис.35б).

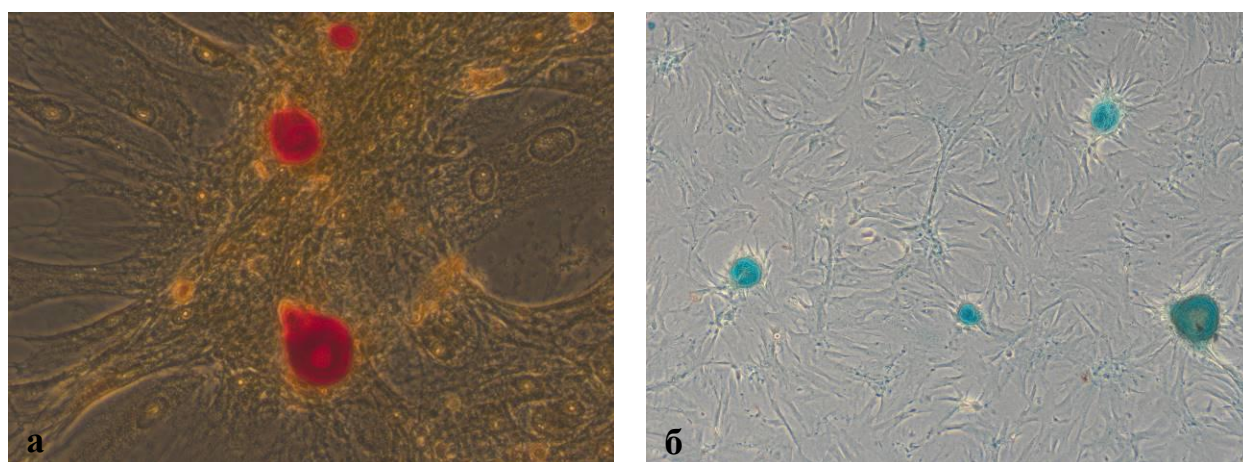


Рис 35. Остеогенная и хондрогенная дифференцировка МСК. а - Отложение кальцификатов в культуре МСК пупочного канатика крысы под действием дифференцировочной среды. Окрашивание ализариновым красным S, рН=4,1, x200; б - отложение мукополисахаридов в экстрацеллюлярном матриксе в культуре МСК пупочного канатика крысы под действием дифференцировочной среды. Окрашивание альциановым синим, рН=2,5, x50.

Таким образом, прикрепившиеся к пластику клетки, выделенные из пупочного канатика (Вартонова студня) крыс, имеют на своей поверхности маркеры мезенхимальных стромальных клеток CD73, CD90 и CD105 и не экспрессируют маркеры гемопоэтических клеток CD45, CD34, CD11b, CD19. Клеточные культуры МСК, выделенные из пупочного канатика крысы успешно подвергаются дифференцировке в 3 различных направлениях: адипогенном, остеогенном и хондрогенном. При действии коммерческой адипогенной среды наблюдали появление липидных капель, которое подтвердилось окрашиванием на нейтральный жир Oil Red O. Интенсивность и распространенность окрашивания увеличивалась по мере продолжительности дифференцировки. При действии коммерческой остеогенной среды через 3 недели появлялись островки кальцификатов вне клеток, которые выявлялись окрашиванием ализариновым красным S. При действии коммерческой хондрогенной среды через 20-28 суток формировались конгломераты клеток (узелки), во внеклеточном матриксе которых выявляли отложения мукополисахаридов с помощью красителя альцианового синего.

3.8.2 Влияние трансплантации МСК пупочного канатика на выживаемость крыс и пролиферативную активность гепатоцитов после субтотальной резекции печени

Мультипотентные стромальные клетки (МСК) являются одним из ключевых участников репаративных процессов у млекопитающих, в том числе и в паренхиматозных органах [Chistiakov D.A., 2012]. Способность трансплантированных МСК стимулировать восстановительные процессы в поврежденной печени продемонстрирована во многих работах [Wu X.-B., R. Tao, 2012]. Опубликованные данные свидетельствуют о наличии нескольких механизмов такого влияния. Заместительный механизм предполагает, что МСК способны дифференцироваться в гепатоциты и холангиоциты [Yin L. et

al., 2012]. Паракринный механизм обусловлен способностью МСК секретировать ряд биологически активных веществ, стимулирующих регенерацию поврежденной печени [Li Q. et al., 2013].

После субтотальной резекции во всех группах гибель животных фиксировали в течение первых трех суток после операции, что, по-видимому, было связано с развивающейся печеночно-клеточной недостаточностью. Среди крыс, остававшихся живыми более трех суток после операции, гибели не наблюдали. Исходя из этого, выживаемость животных определяли в период первых трех суток после операции. В группе животных с введением МСК пупочного кантика количество особей, выживших после субтотальной гепатэктомии, было статистически значимо больше ($p < 0,05$), чем в группе сравнения (Рис.36).

У животных опытной группы с введением МСК и без трансплантации масса печени восстанавливалась по нашим данным через 10 суток после операции: отношение массы печени к массе крысы не отличалось от такового у одновозрастных интактных крыс (Таблица 5, $p > 0,05$).

Таблица 5. Отношение массы печени к массе тела крысы ($M \pm \text{ст.отклонение}, \%$)

Время после операции, сутки	Группа с введением МСК	Группа без введения МСК
Интактный контроль	4,5 $\pm$ 0,9	
3	1,8 $\pm$ 0,3*	1,4 $\pm$ 0,1*
7	2,4 $\pm$ 0,7*	2,7 $\pm$ 0,3*
10	3,1 $\pm$ 0,5	2,8 $\pm$ 0,6
*-статистически значимые отличия по сравнению с интактным контролем, $p < 0,05$		

Несмотря на одинаковую скорость восстановления массы печени трансплантация МСК стимулировала пролиферацию гепатоцитов (Рис.37а,б).

Митотический индекс гепатоцитов в регенерирующей печени после трансплантации в селезенку МСК был значимо больше по сравнению с животными без трансплантации МСК через 3 и 10 суток после операции (Рис.37а, $p<0,05$). Через 7 суток после операции митотический индекс гепатоцитов у животных с введением МСК был достоверно ниже, чем у животных без трансплантации клеток ($p<0,05$, Рис.37а). Сходная динамика выявлена и с помощью иммуногистохимического маркера пролиферации Ki67(Рис.37б). Возможно, трансплантация МСК не только стимулирует пролиферацию гепатоцитов, но и синхронизирует их митотические циклы, что приводит к формированию волн пролиферации, между которыми отмечается временное снижение митотической активности гепатоцитов [Lambotte L. et al., 1997].

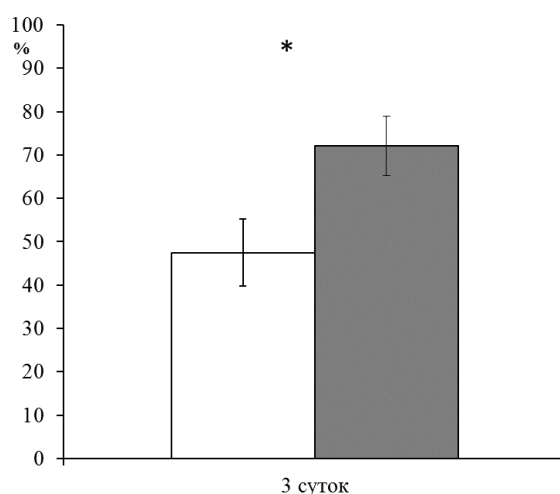


Рис. 36. Выживаемость крыс после трансплантации МСК. Белой столбик - доля выживших крыс без трансплантации МСК, серый столбик – доля выживших крыс с трансплантацией МСК пупочного канатика, по оси абсцисс – время после субтотальной резекции, по оси ординат – доля выживших животных, данные представлены в виде средних с доверительными интервалами, *-статистически значимые отличия по сравнению с животными, которым не трансплантировали МСК, $p<0,05$. Трансплантация МСК пупочного канатика крысам после субтотальной резекции статистически значимо увеличивала выживаемость животных.

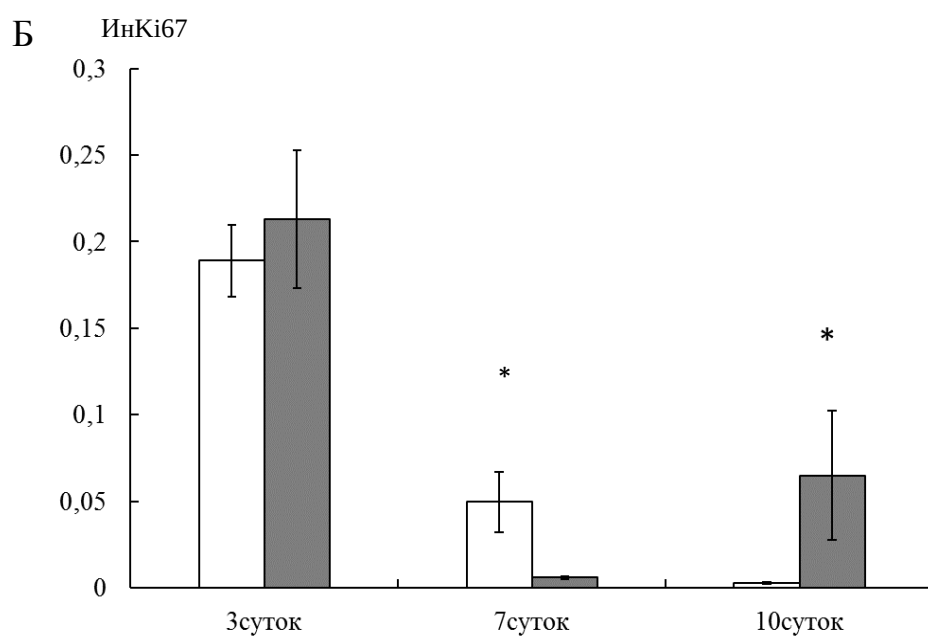
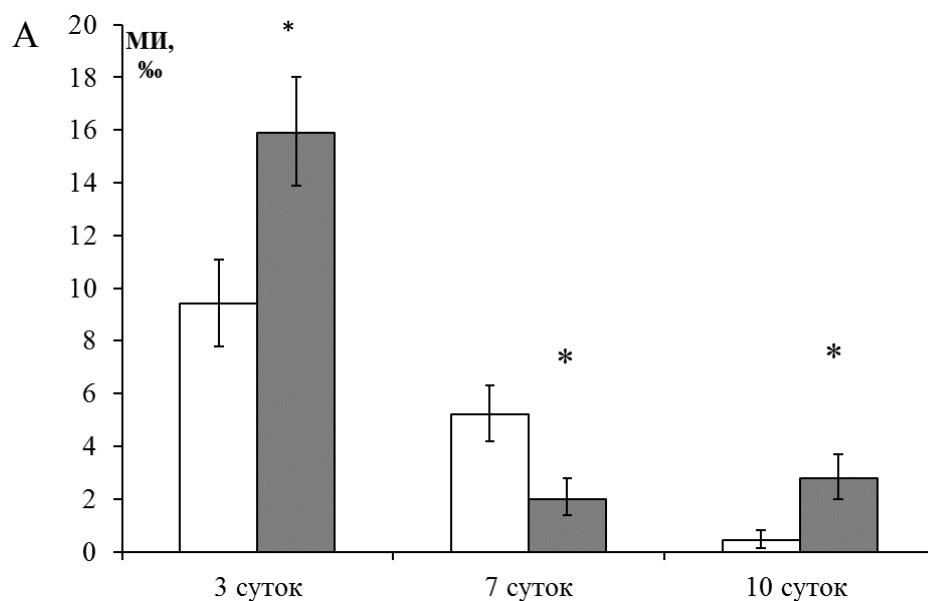


Рис. 37. Влияние трансплантации МСК пупочного канатика на пролиферацию гепатоцитов в регенерирующей печени крыс после субтотальной резекции.

А. Митотический индекс гепатоцитов. По оси абсцисс – время после операции в сутках, по оси ординат – митотический индекс (МИ) в ‰.

Б. Индекс Ki 67 гепатоцитов. По оси абсцисс – время после операции в сутках, по оси ординат индекс Ki 67 гепатоцитов (Ин Ki 67).

Белые столбики – показатель пролиферации гепатоцитов в печени крыс после субтотальной резекции без трансплантации МСК с введением 0,9% раствора NaCl, серые столбики – показатель пролиферации гепатоцитов в печени крыс после субтотальной резекции с трансплантацией МСК пупочного канатика. Данные представлены в виде средних с доверительными интервалами, *-статистически значимые отличия по сравнению с животными, которым не трансплантировали МСК, $p < 0,05$.

Трансплантация МСК крысам после субтотальной резекции вызывала изменение пролиферации гепатоцитов: статистически значимый более высокий МИ гепатоцитов через 3 суток после резекции, далее достоверное снижение и снова значимое увеличение показателя МИ, в общих чертах данная динамика характерна и для индекса Ki67.

3.8.3 Изучение миграции, дифференцировки и элиминации трансплантированных МСК пупочного канатика при регенерации печени крыс после субтотальной резекции

Способность МСК мигрировать в область повреждения рассматривают как одно из ключевых свойств МСК, которое позволяет использовать данный вид клеток в терапевтических целях [Chen F.-M. et al., 2011]. По мнению многих исследователей, наиболее приемлемым способом трансплантации МСК с целью стимуляции регенерации печени является введение клеток в селезенку, что связано, прежде всего, с общностью кровотока двух органов [Li J. et al., 2011].

Меченые МСК после трансплантации обнаруживали в селезенке на всех сроках исследования (Рис.38 а,в,д). Через 3 суток визуализировали треки введения – скопления меченых клеток в местах инъекций (Рис. 38а). Через 7 и 10 суток меченые клетки обнаруживали преимущественно в красной пульпе селезенки, где они располагались диффузно. Единичные клетки, несущие метку РКН 26 можно было видеть и в белой пульпе (Рис.38 в,д).

Было показано, что МСК после трансплантации в селезенку способны мигрировать в печень, но в очень ограниченном количестве. В печени через 3 суток после трансплантации уже обнаруживали меченые клетки, при этом они лежали чаще всего одиночно (Рис.39б). Наибольшее число меченых клеток в печени выявили через 7 суток после трансплантации, при этом клетки располагались группами от 1 до 4 (Рис.39г). Через 10 суток после субтотальной резекции количество клеток уменьшалось по сравнению с предыдущим сроком, меченые клетки располагались чаще всего одиночно (Рис.39е).

Таким образом, миграции клеток из селезенки в печень была наиболее интенсивна в период между 3 и 7 сутками после трансплантации, а далее снижалась. Стоит отметить, что масса печени у животных, которым трансплантировали МСК, восстанавливалась к 10 суткам после операции. Исходя из этого, одной из причин снижения числа мигрирующих в печень МСК после 7 суток, видимо, является завершение восстановительного процесса в печени и постепенное уменьшение в ней экспрессии факторов хоминга МСК. Другой причиной уменьшения числа меченых клеток в печени может быть элиминация трансплантированных клеток.

В связи с этим, изучалась дальнейшая судьба трансплантированных МСК пупочного канатика.

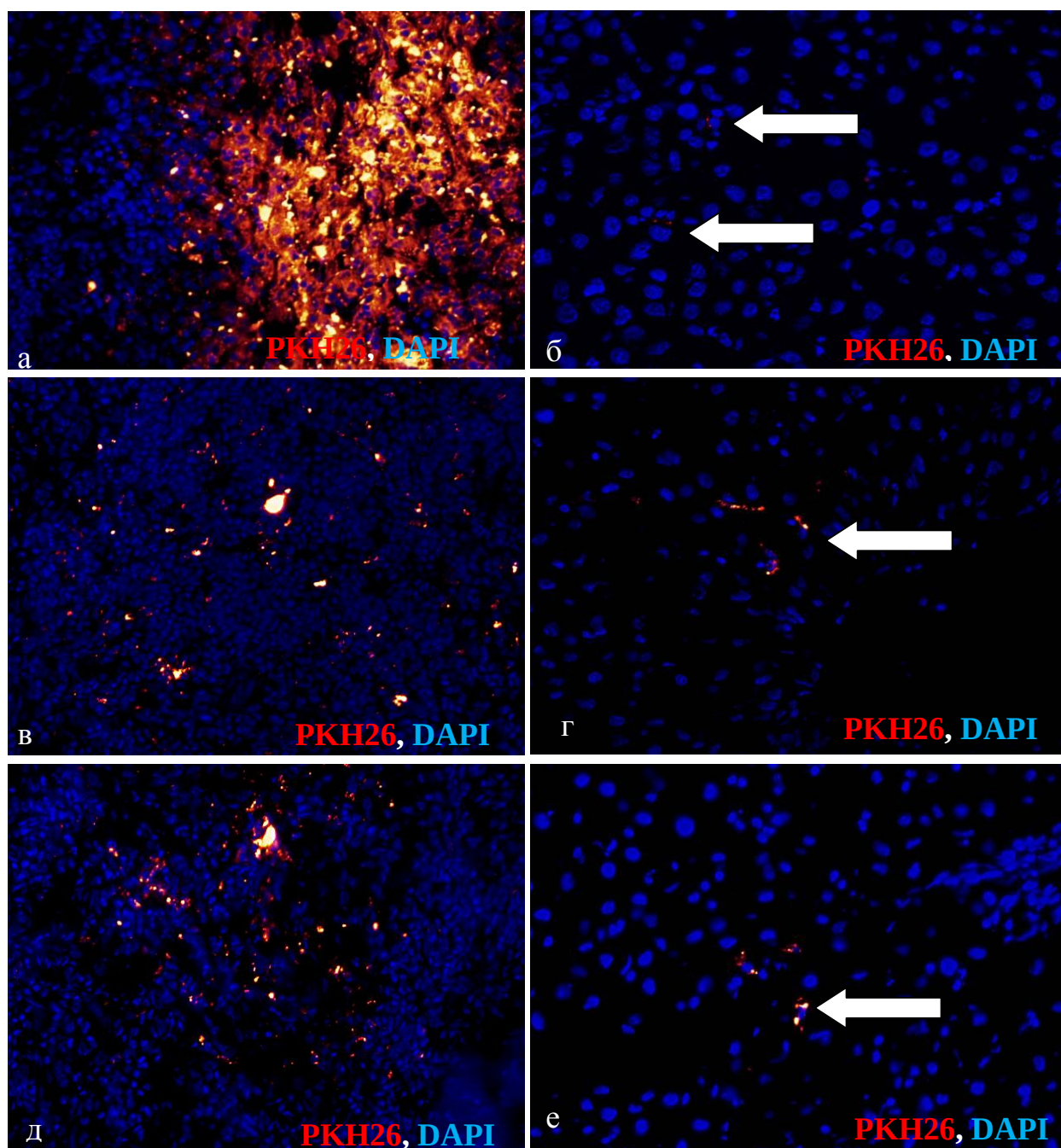


Рис.38. Миграция в печень трансплантированных в селезенку МСК пупочного кантика крыс после субтотальной резекции печени. Локализация меченных PKH26 МСК в селезенке – а,в,д, обнаружение меченных клеток в печени – б,г,е; через 3 суток после операции – а,б, 7 суток после субтотальной резекции – в,г, 10 суток после резекции – д,е. Стрелками указаны меченные PKH26 клетки, мигрировавшие в печень. Флуоресцентная микроскопия: красное свечение – PKH26, ядра докрашены DAPI – синее свечение, $\times 400$.

Как уже отмечалось, одним из возможных терапевтических механизмов влияния МСК пупочного канатика является их способность дифференцироваться в разные типы клеток печени [Wu X.-B., R. Tao, 2012].

Дифференцировка МСК в гепатоциты в условиях регенерации печени после субтотальной резекции изучена недостаточно. Имеется сообщение о том, что биоинкапсулированные МСК при введении в брюшную полость крысам после субтотальной резекции печени через 2 недели после трансплантации начинают экспрессировать маркеры гепатоцитов цитокератин 8, 18 и альбумин [Liu Z.C., Chang T.M., 2006].

С помощью иммуногистохимических маркеров исследовалась возможность дифференцировки МСК в направлении паренхиматозных клеток печени – гепатоцитов и холангиоцитов. Получены данные, свидетельствующие о том, что трансплантированные МСК пупочного канатика не экспрессируют цитокератин 18 и 19 (Рис.39а,б).

Также изучалась способность МСК дифференцироваться в клетки стромы. Введенные клетки не экспрессировали α -гладкомышечный актин, то есть не дифференцировались в гладкие миоциты или миофибробласты (Рис.39 в,д). Однако на 3 и 10 сутки были обнаружены единичные клетки, меченные РКН26, и несущие маркер эндотелиоцитов CD31 (Рис. 39 г).

Было обнаружено, что полученные МСК пупочного канатика крыс способны к дифференцировке в направлении эндотелиоцитов. При сокультивировании с культурой эндотелиальных клеток (ЭК) в матрикеле МСК способны экспрессировать CD31 (Рис.40, Рис. 41). На 5-7-е сутки после сокультивирования МСК и ЭК наблюдалось появление центров спрутинга — разрастания клеток из образованных ранее кластеров. Клетки имели характерную вытянутую форму и формировали стабильную сеть со множеством точек ветвления. При этом МСК начинали экспрессировать CD31, что подтверждает их эндотелиальную дифференцировку (Рис. 41).

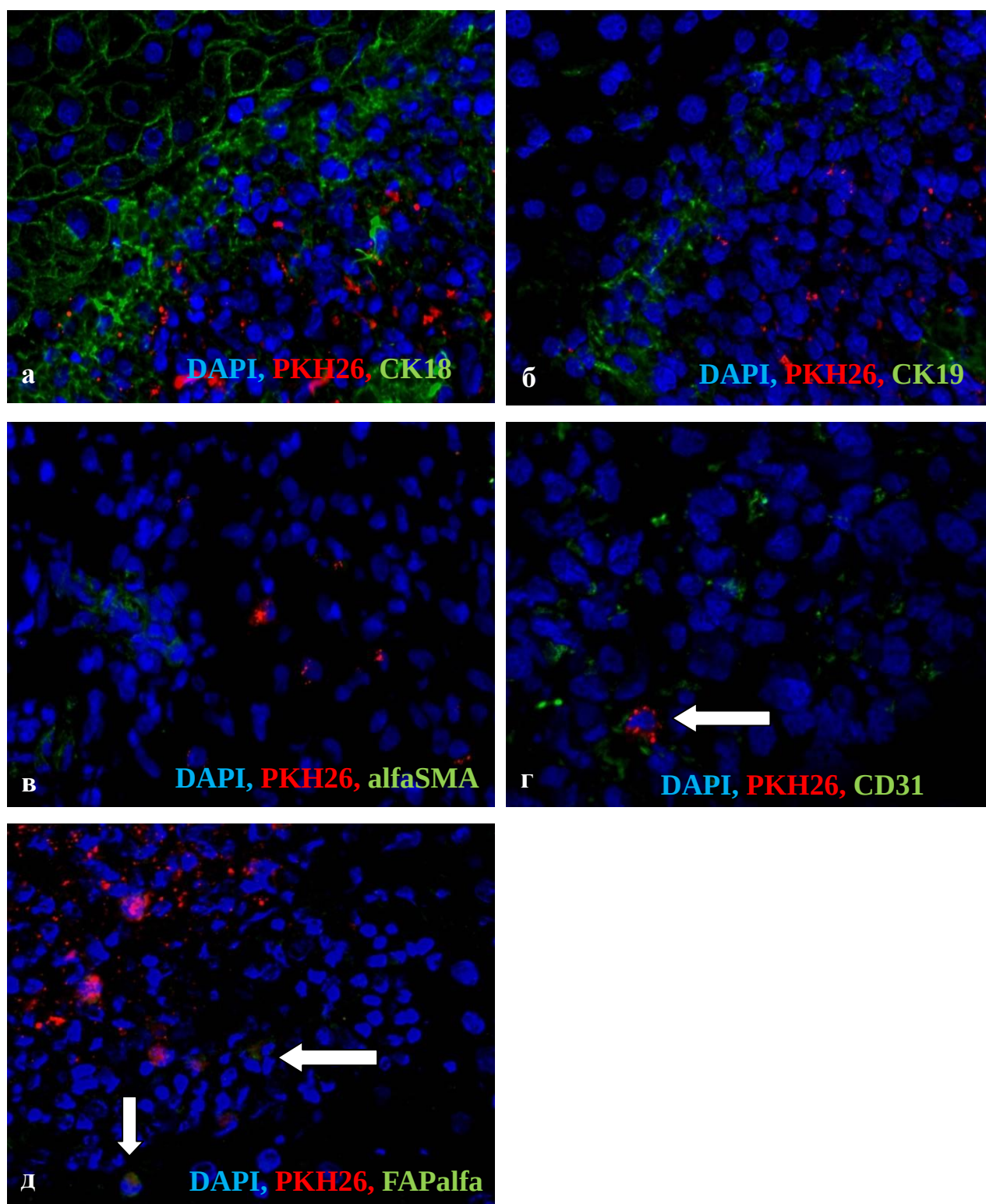


Рис.39. Изучение направлений дифференцировки трансплантированных МСК пупочного канатика, иммуногистохимическое исследование: а – экспрессия цитокератина 18 (СК18), б – экспрессия цитокератина 19 (СК19), в – экспрессия α -гладкомышечного актина (α SMA), г – экспрессия CD31, д – экспрессия FAP α . Флуоресцентная микроскопия,

соответствующие маркеры окрашены вторыми антителами, конъюгированными с FITC – зеленое окрашивание, трансплантированные клетки метили PKH26 – красное свечение, ядра докрашены DAPI – синее свечение, $\times 400$.

Трансплантированные клетки не дифференцировались в гепатоциты, холангиоциты, гладкие миоциты, однако в единичных клетках, несущих PKH26 обнаруживалась экспрессия CD31 и FAP α (указаны стрелками).

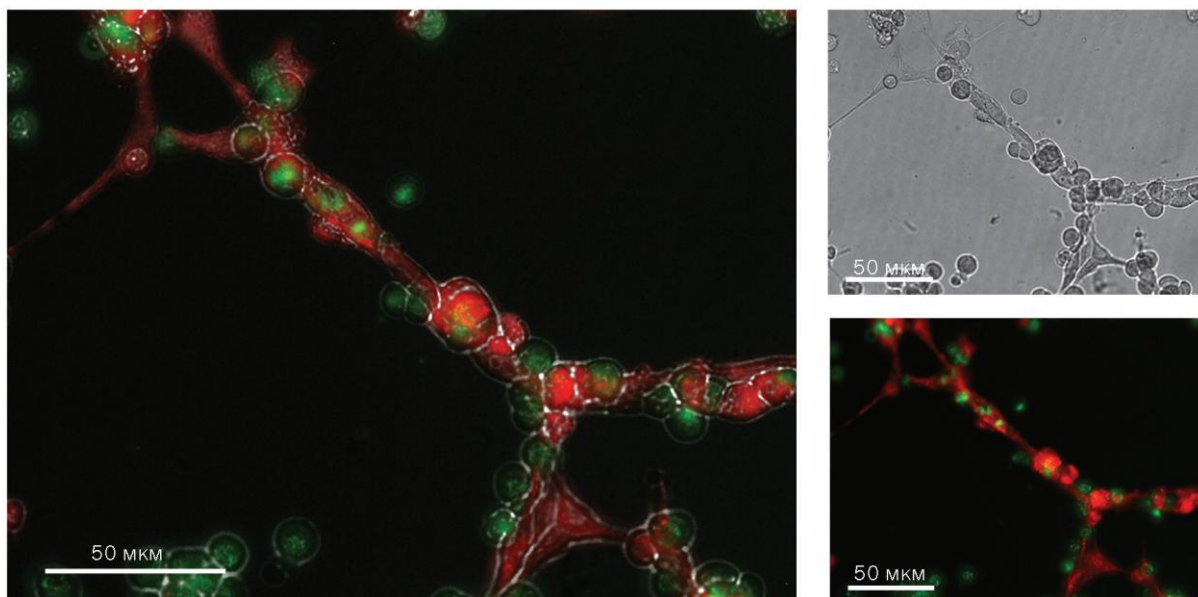


Рис. 40. Формирование тубулярных структур в матриксе базальной мембраны МСК пупочного канатика, МСК и ЭК (эндотелиальные клетки) линии Ea.hy926 в соотношении 1:1 или только ЭК линии Ea.hy926 Красное свечение — PKH26+МСК, зеленое свечение — PKH67+ЭК.

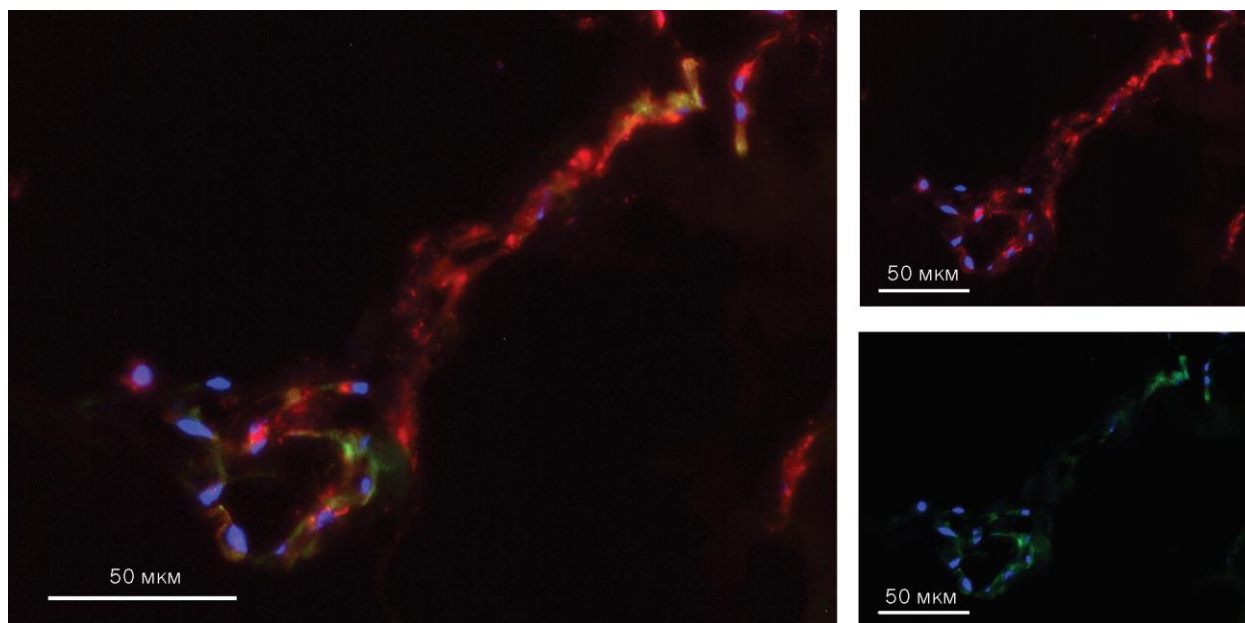


Рис. 41. Эндотелиальная дифференцировка МСК в процессе спрутинга: экспрессия CD31 (зеленое свечение) в МСК пупочного канатика, меченных PKH26 (красное свечение). Ядра клеток докрашены DAPI.

Таким образом, при введении МСК пупочного канатика в селезенку после субтотальной резекции печени выявлено, что трансплантированные клетки мигрируют в печень, но не дифференцируются в гепатоциты, холангиоциты, гладкие миоциты или миофибробласты. При этом единичные клетки, видимо, дифференцировались в эндотелиоциты. Полученные данные свидетельствуют о том, что заместительный механизм стимуляции регенерации не является ведущим для МСК пупочного канатика в случае восстановления массы печени крыс после субтотальной резекции.

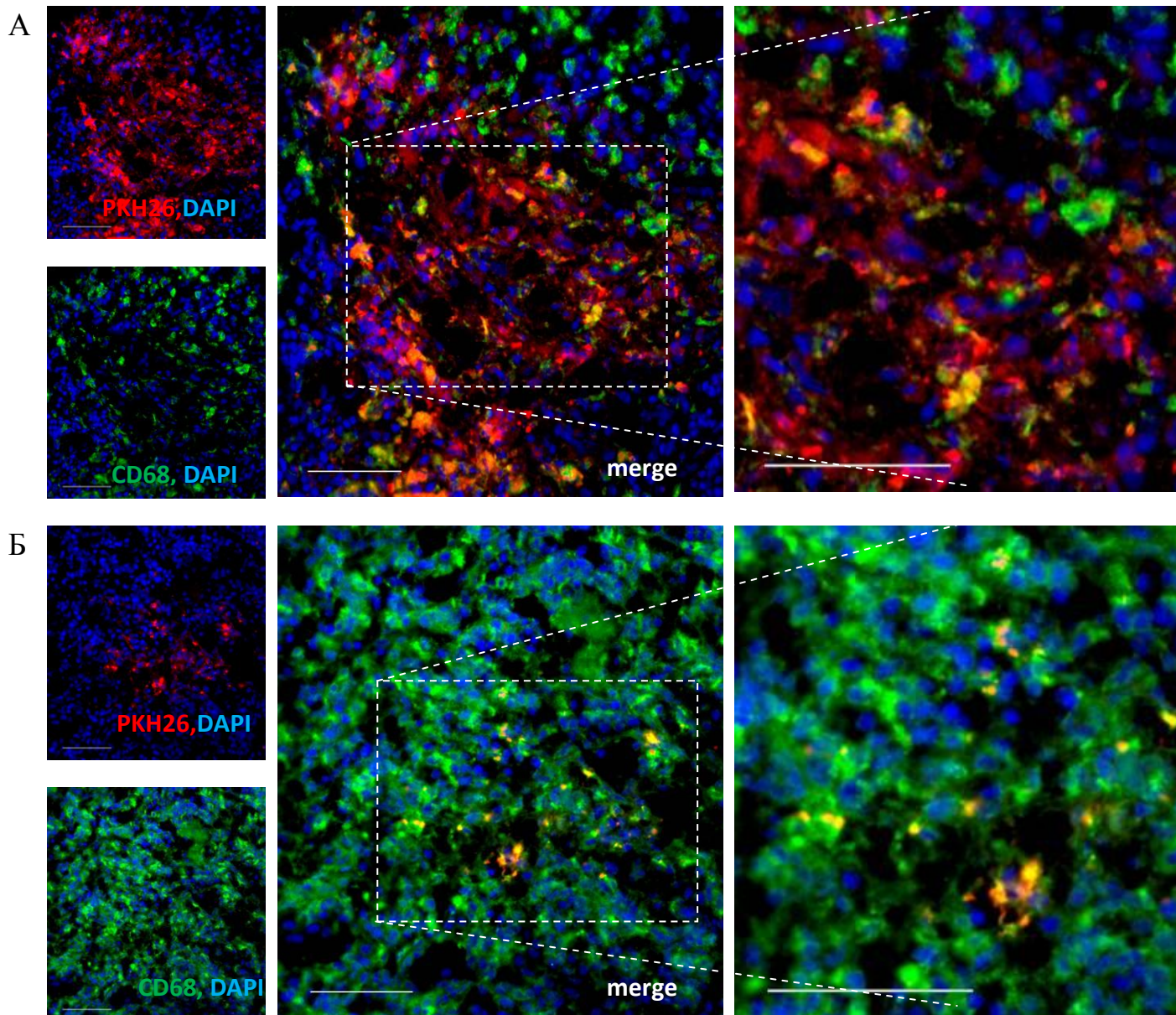


Рис. 42. Элиминации аллогенных МСК пупочного канатика в селезенке после субтотальной резекции печени. А – 24 часа, Б – 72 часа после интраспленальной трансплантации. Флуоресцентная микроскопия криосрезов селезенки, окрашенных антителами к CD68: PKH26 – красный, CD68 – зеленый, ядра клеток докрашены DAPI – синий. Масштабный отрезок: 50 мкм.

Через 24ч и 72ч после трансплантации подавляющее большинство клеток, несущих PKH26, экспрессировали маркер макрофагов CD68, что свидетельствует о элиминации введенных клеток.

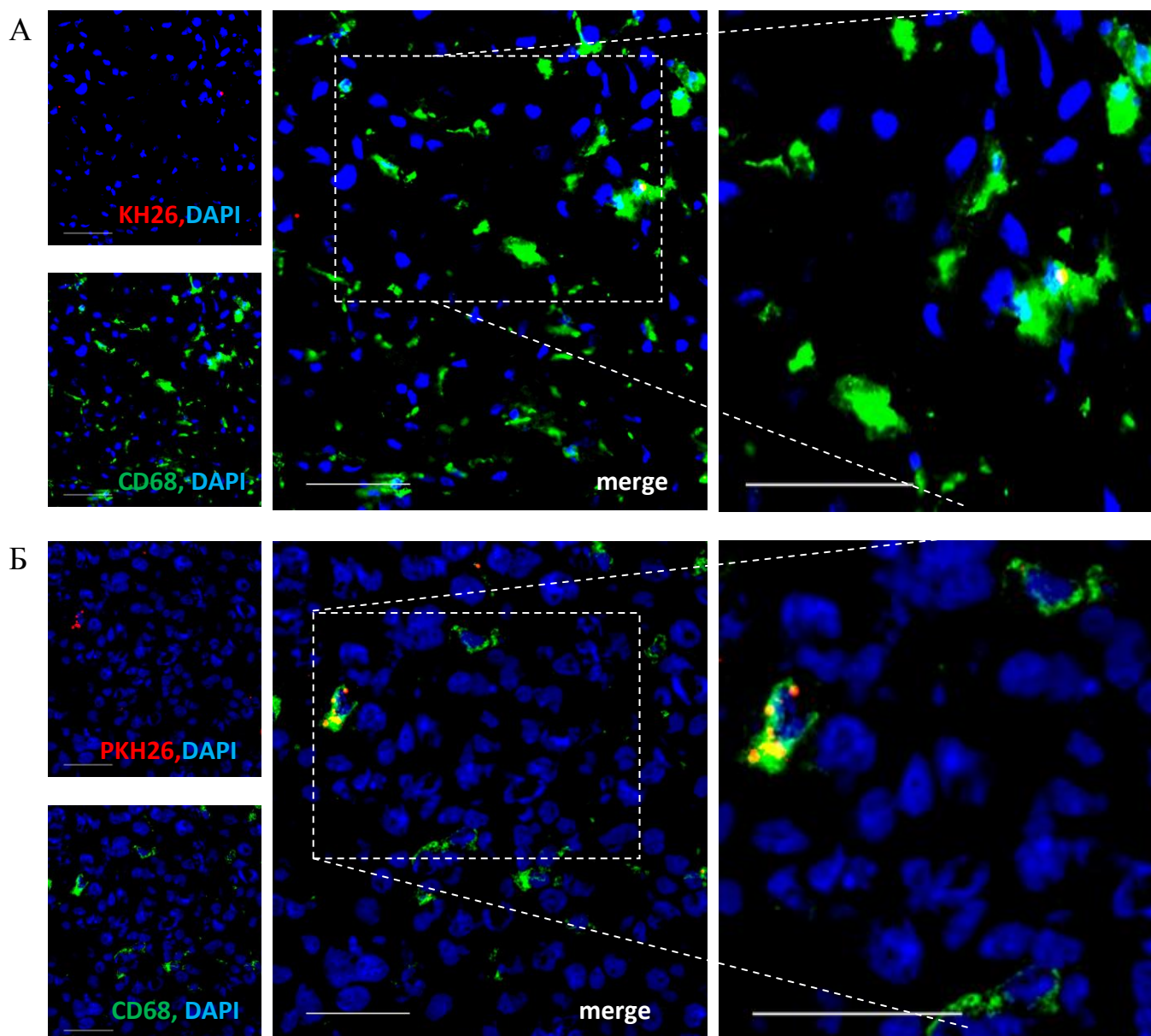


Рис. 43. Элиминации аллогенных МСК пупочного канатика в регенерирующей печени. А – 3 суток, Б – 10 суток после интраспленальной трансплантации. Флуоресцентная микроскопия криосрезов селезенки, окрашенных антителами к CD68: PKH26 – красный, CD68 – зеленый, ядра клеток докрашены DAPI – синий. Масштабный отрезок: 50 мкм.

Через 3 и 10 суток после трансплантации подавляющее большинство клеток, несущих PKH26, экспрессировали маркер макрофагов CD68, что свидетельствует о элиминации введенных клеток.

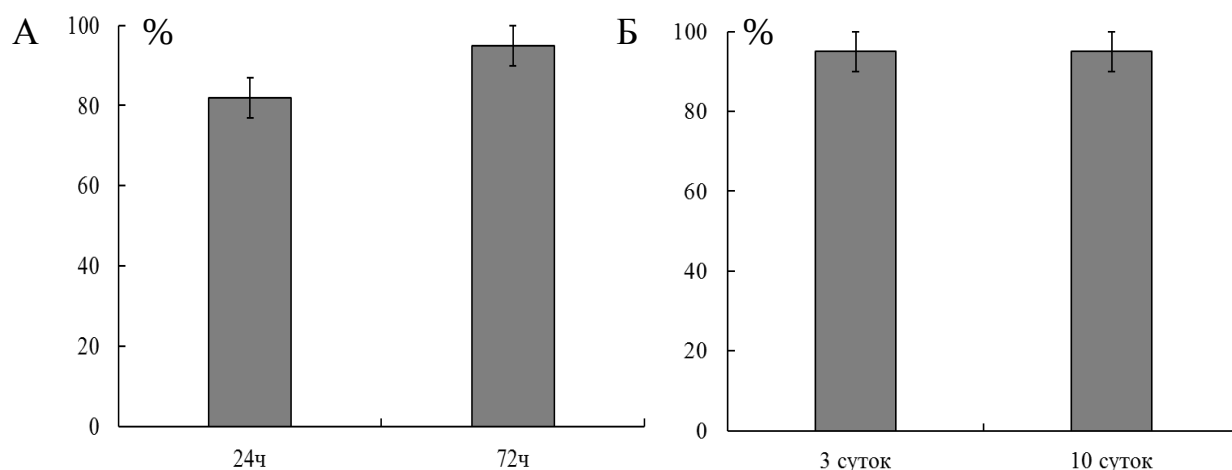


Рис. 44. Элиминации аллогенных МСК пупочного канатика в селезенке (А) и регенерирующей печени (Б). По оси абсцисс – время после операции, по оси ординат - доля CD68+PKH26+-клеток. Данные представлены в виде средних и ошибок средних.

Элиминация трансплантированных клеток достигает 100 % уже на ранних этапах регенерации печени.

Какова же дальнейшая судьба трансплантированных МСК. Введение аллогенных МСК пупочного канатика не влияло на распределение макрофагов в селезенке, которые располагались в селезеночных тяжах красной пульпы и, в меньшей степени, мантийной и маргинальной зонах белой пульпы. При иммуногистохимическом исследовании часть меченых клеток реагировала с антителами к маркеру макрофагов CD68 (Рис. 42а,б), что свидетельствует о фагоцитозе макрофагами меченых МСК или фрагментов их мембран. Через 24 часа после трансплантации 83,2±4,6% PKH26-положительных клеток окрашивалась антителами к CD68. А через 3 суток почти 100,0% трансплантированных клеток были CD68-позитивными ($p<0,05$) (Рис. 44а).

В печени клетки, содержащие флуоресцентную метку, обнаруживали через 3 суток (Рис. 43а). Меченые клетки диффузно распределялись по ткани регенерирующей печени, чаще всего в одном поле зрения (x400) можно было

выявить от 1 до 4 клеток. При окрашивании криосрезов антителами к CD68 обнаружили, что $96,8 \pm 2,2\%$ меченых клеток имели фенотип PKN26+CD68+ (Рис. 43б, Рис.44б).

Через 10 суток меченые клетки в печени сохраняли свою морфологию и локализацию (Рис. 43б). Доля меченых клеток, окрашенных с помощью антител к маркеру макрофагов, не изменялась и составляла $96,3 \pm 2,6\%$ ($p > 0,05$), (Рис. 44б).

Как следует из полученных результатов, элиминация аллогенных МСК происходит с большей интенсивностью в селезенке – органе с высоким содержанием активно фагоцитирующих макрофагов. Скорость элиминации трансплантированных клеток в селезенке может быть очень важна для исследований, в которых данный способ введения рассматривают как достаточно эффективный для доставки клеток в поврежденную печень (вследствие общности кровотока этих органов) [Li J. et al., 2011, Sun S. et al., 2013]. Показано, что через 3 суток в селезенке практически все трансплантированные клетки были элиминированы, а маркер PKN26 присутствовал только в макрофагах, при этом в печени все же наблюдали единичные меченые клетки с фенотипом CD68-, что подтверждает их миграцию из селезенки. Появление меченых макрофагов в печени может свидетельствовать об элиминации мигрировавших аллогенных МСК в самой печени, хотя невозможно исключить вероятность миграции в печень макрофагов селезенки, фагоцитировавших метку.

Несмотря на элиминацию трансплантированных аллогенных МСК, они все же оказывают положительный эффект на течение репаративных процессов.

3.8.4 Влияние трансплантации МСК пупочного канатика на соотношение типов макрофагов в регенерирующей печени крыс после субтотальной резекции

МСК, как и многие другие клетки, синтезируют и секретируют широкий спектр регуляторных молекул, цитокинов, факторов роста и дифференцировки. Многие терапевтические эффекты МСК все чаще объясняют их паракринной активностью [Tang J. et. al., 2010]. При протеомном анализе кондисианированной среды при культивировании МСК показано, что при влиянии воспаления, гипоксии и механического давления меняется секреторный профиль клеток. Паракринные эффекты МСК можно определить как “трофический”, “иммуномодуляторный”, и “хемоаттрактантный” [Фатхудинов Т.Х. и соавт., 2013]. Все они могут иметь большое значение при репарации печени.

При трансплантации МСК пупочного канатика крысам после субтотальной резекции обнаружилось, что через 7 суток после операции происходило статистически значимое по сравнению с животными, которым не вводили клетки, снижение общего количества макрофагов в печени, экспрессирующих CD68 (Рис.45а). При этом на том же сроке в печени крыс, которым вводили МСК достоверно по сравнению с соответствующим контролем повышалось количество так называемых М2 макрофагов, которые экспрессировали CD206 (Рис.45б).

Таким образом, полученные данные согласуются с результатами работ, в которых была показана способность МСК влиять на популяцию тканевых макрофагов в ходе репаративного процесса за счет паракринного эффекта.

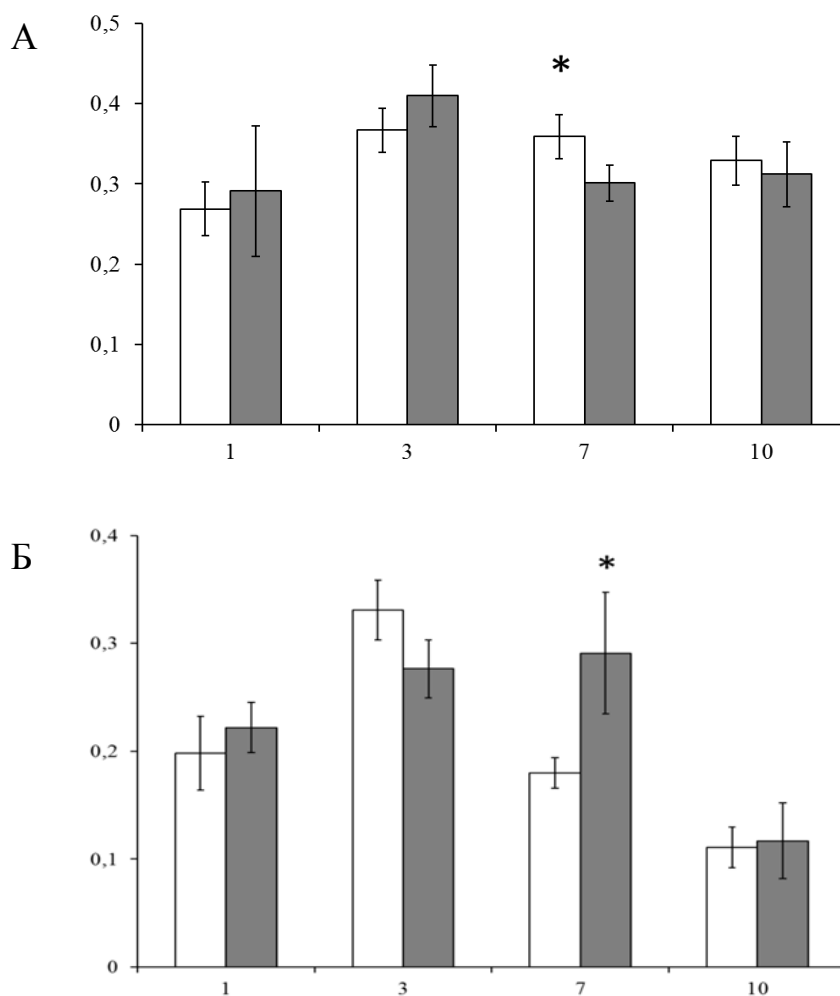


Рис. 45. Влияние трансплантации МСК пупочного кантика на состояние системы макрофагов регенерирующей печени крыс после субтотальной резекции. А. Динамика CD68+ макрофагов. Б. Динамика CD206+ макрофагов. Белые столбики – доля макрофагов в печени крыс без трансплантации МСК с введением 0,9% раствора NaCl, серые столбики – доля макрофагов в печени крыс, которым трансплантировали МСК. Данные представлены в виде средних и доверительных интервалов, по оси ординат – доля клеток, по оси абсцисс – срок после операции, *-статистически значимые отличия по сравнению с животными, которым не трансплантировали МСК, $p < 0,05$

Обнаружено, что на 7 сутки после субтотальной резекции и трансплантации МСК в печени оперированных животных снижалось количество CD68+ макрофагов и увеличивалась достоверно доля CD206+ макрофагов.

3.8.5 Влияние трансплантации МСК пупочного канатика на экспрессию генов регуляторных молекул в регенерирующей печени крыс после субтотальной резекции

Одним из возможных механизмов терапевтической активности МСК рассматривают, так называемый паракринный эффект, то есть способность МСК при попадании в поврежденный орган синтезировать или стимулировать синтез активных веществ, способствующих регенерации. Считается, что при тяжелых травмах у гепатоцитов может истощаться способность к пролиферации, а трансплантированные МСК могут ее стимулировать за счет выработки синтеза необходимых факторов роста [Li Q. et al., 2013].

Мы также изучили экспрессию ряда генов, характерных как для М1-субпопуляции макрофагов, так и для М2-макрофагов в регенерирующей печени. При этом изменение экспрессии генов цитокинов, так же как и генов факторов роста при трансплантации МСК пупочного канатика по сравнению с животными, которым не вводили клетки, не было выявлено (Рис.46а,б,в,г).

Исходя из полученных данных, остается неясным за счет, каких молекулярных механизмов МСК оказывали влияние на пролиферацию гепатоцитов, а также на соотношение функциональных типов макрофагов в регенерирующей печени.

Стоит заметить, что МСК обладают способностью синтезировать богатый набор биологически активных молекул [Арутюнян И.В. и соавт., 2015], при этом эффект оказываемый МСК является дозозависимым и очень часто кратковременным, что затрудняет изучение паракринного эффекта *in vivo*. С другой стороны, молекулярные механизмы, регулирующие пролиферацию гепатоцитов, поляризацию макрофагов изучены не до конца, особенно в условиях экстремальных травм печени.

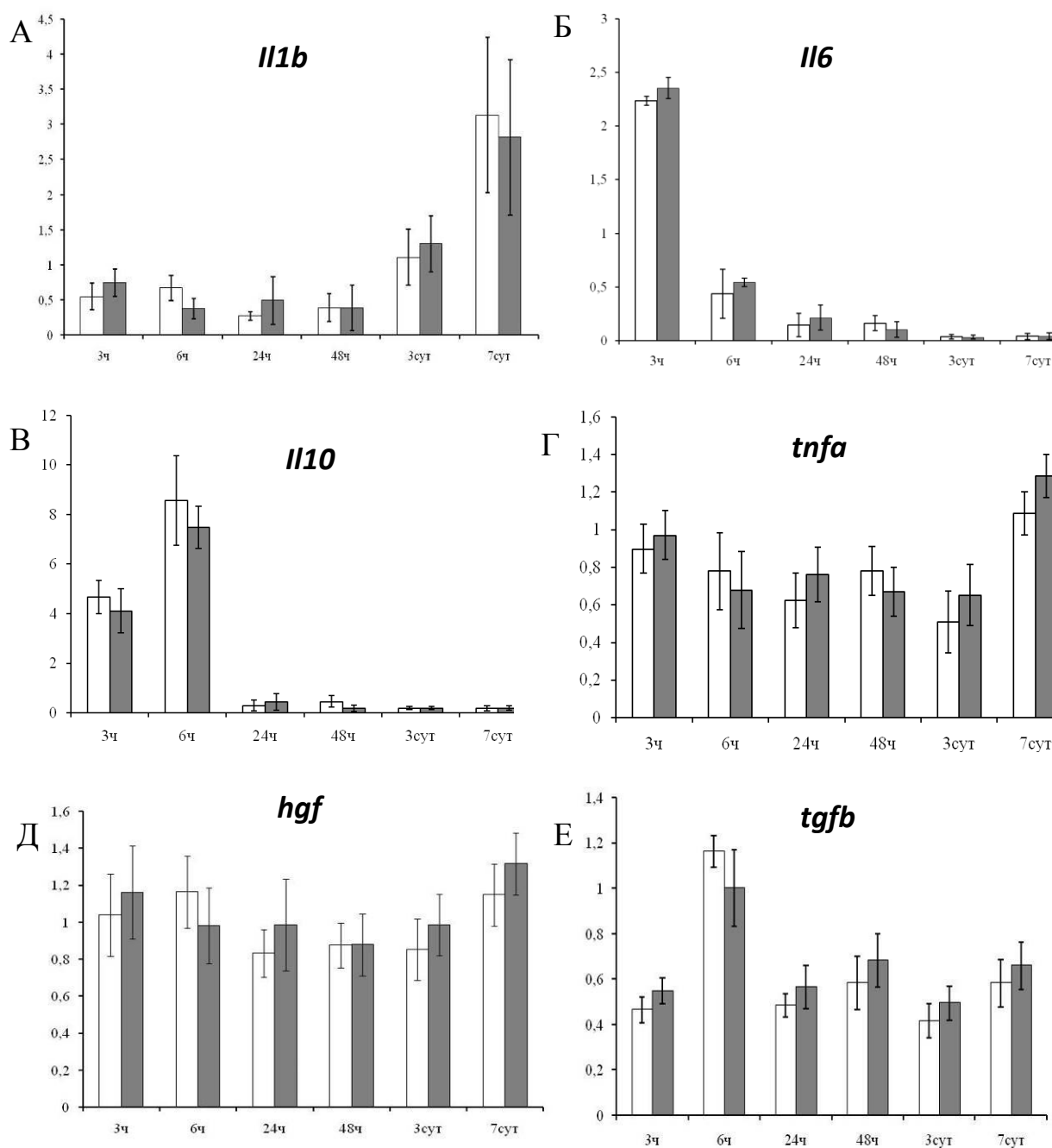


Рис. 46. Влияние трансплантации МСК пупочного канатика на экспрессию генов цитокинов и факторов роста в печени крыс после субтотальной резекции. Белые столбики – экспрессия в печени крыс без трансплантации МСК с введением 0,9% раствора NaCl, серые столбики – экспрессия в печени крыс, которым трансплантировали МСК. Данные представлены в виде средних и доверительных интервалов, по оси ординат относительная экспрессия в у.е., по оси абсцисс – срок после операции, *-статистически значимые отличия по сравнению с животными, которым не трансплантировали МСК, $p < 0,05$.

3.8.6 Влияние трансплантации МСК пупочного канатика на активность прогениторных клеток печени крыс после субтотальной резекции

При условии существования резидентных прогениторных клеток печени на их жизнедеятельность может влиять весь спектр факторов роста и цитокинов, выделяемых МСК. Трансплантированные клетки могут стимулировать их мобилизацию, обеспечивать хоминг резидентных стволовых клеток в область повреждения, повышение пролиферативной активности и дифференцировку в различных направлениях. Для некоторых органов подобный механизм терапевтической активности МСК рассматривается как ведущий [Leri A. et al., 2005], для регенерации печени имеются лишь косвенные указания на способность МСК стимулировать резидентные прогениторные клетки [Bird T.G. et al., 2013].

Влияние трансплантации МСК пупочного канатика на активность альтернативных путей регенерации печени (активация прогениторных клеток печени, трансдифференцировка гепатоцитов в холангиоциты и наоборот) изучалось на модели регенерации печени крыс после субтотальной резекции. Прогениторные клетки печени выявлялись с помощью маркера холангиоцитов CK19, а также с помощью маркера SOX9.

Динамика CK19⁺ и SOX9⁺ клеток в печени после субтотальной резекции не отличалась от динамики данных маркеров у животных, которым вместо суспензии МСК вводили 0,9% раствора NaCl (Рис.47 а,б). Резкого увеличения количества CK19⁺клеток за пределами желчных протоков не обнаружено (Рис.47а). Через 7 суток у подопытных животных, которым вводили МСК и без введения клеток, обнаруживалось большое количество гепатоцитов, экспрессирующие SOX9 (Рис.47б). При этом какие-либо клетки с промежуточным между гепатоцитами и холангиоцитами фенотипом отсутствовали.

Таким образом, на основании полученных данных мы сделали можно заключить, что МСК пупочного канатика не вызывают активацию

резидентных прогениторных клеток печени в условиях регенерации после субтотальной резекции печени крыс.

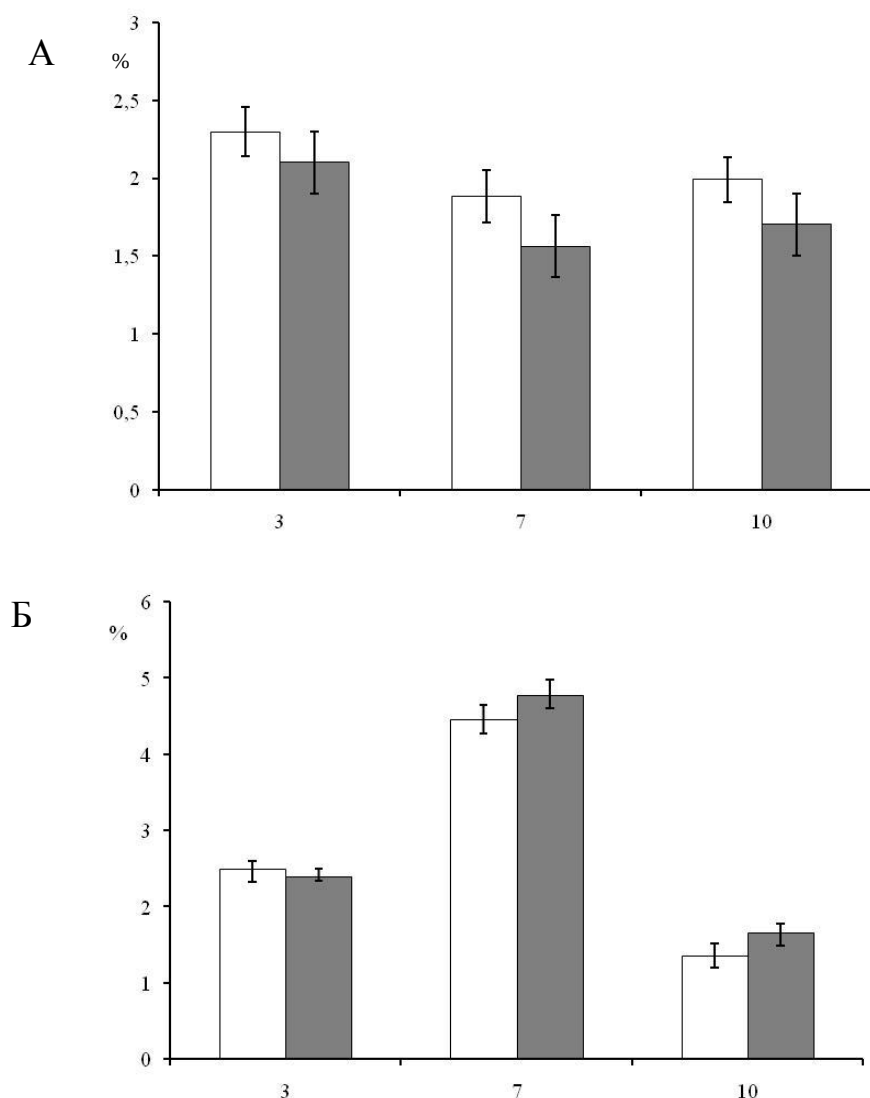


Рис. 47. Динамика CK19+ клеток в печени крыс после субтотальной резекции и трансплантации МСК пупочного кантика. Динамика SOX9+ клеток в печени крыс после субтотальной резекции и трансплантации МСК пупочного кантика. Белые столбики – крысы без трансплантации МСК с введением 0,9% раствора NaCl, серые столбики – печень крыс, которым трансплантировали МСК. Данные представлены в виде средних и доверительных интервалов, по оси ординат доля клеток, по оси абсцисс – срок после операции, *-статистически значимые отличия по сравнению с животными, которым не трансплантировали МСК, $p < 0,05$

3.8.7 Влияние трансплантации МСК пупочного канатика на функцию митохондрий клеток печени крыс после субтотальной резекции

Одним из возможных механизмов стимуляции репаративных процессов может быть воздействие МСК на энергетический обмен клеток. Так интрамиокардиальная трансплантация МСК улучшает потребление глюкозы и показатели окислительного фосфорилирования поврежденного миокарда, при этом в сердце отмечается увеличение экспрессии транскрипционного фактора PGC-1 α , который стимулирует биогенез новых митохондрий, а также дыхание и окислительное фосфорилирование в них [Hughey C.C. et al., 2013]. Другим возможным механизмом благоприятного влияния МСК на энергетический обмен в поврежденных органах в настоящее время рассматривают трансфер митохондрий из трансплантированных клеток в клетки реципиента [Prockop D.J., Oh J.Y., 2012]. Перемещение митохондрий из МСК в другие клетки происходит через прямые межклеточные контакты, так называемые туннельные нанотрубки [Vallabhaneni K.C. et al., 2012].

Влияние трансплантации МСК пупочного канатика на состояние энергетического обмена в гепатоцитах изучали на модели регенерации печени после субтотальной резекции. Обнаружено, что содержание митохондриального белка (нормированное на 1 г ткани) в печени интактных животных было достоверно выше, чем во всех группах после субтотальной резекции ($p < 0,05$, Рис. 48а). В течение первой недели после операции содержание митохондрий в ткани печени не успевало восстановиться до исходного уровня ни в одной из групп (Рис.48а). Однако в группе животных с введением МСК на 7 сутки после резекции содержание митохондриального белка был достоверно выше, чем в группе сравнения ($p < 0,05$, Рис.48б), что свидетельствует о более быстром восстановлении количества митохондрий у животных, получивших инъекции МСК.

На 7 сутки после операции у животных с трансплантацией МСК содержание цитохромов аа3, b и c на 1 г ткани печени не отличалось от интактной печени, в то время как у животных без имплантации МСК наблюдалось их достоверное снижение ($p<0,05$, Рис. 49). На 7 сутки доля содержания цитохромов c и b от соответствующего значения в интактной печени была достоверно выше у животных с трансплантацией МСК относительно животных группы сравнения ($p<0,05$, Рис.49).

Таким образом, введение МСК ускоряло восстановление в ткани печени уровня цитохромов b и c, являющихся функциональными белками и входящими в состав дыхательной цепи митохондрий.

Содержание цитохромов b и c, нормированное на количество внесенных в кювету митохондрий, в обеих группах повышалось на 7 сутки по сравнению с нулевым днем (Рис.50 а,б). В то же время содержание цитохрома аа3 на 7 сутки было повышено только у животных без введения МСК (Рис.50а).

Сравнение показателей скорости митохондриального дыхания клеток печени у животных после внутриселезеночной трансплантации МСК на 7 сутки после операции не выявил достоверных отличий от исходных показателей (Рис. 51а)

У животных без введения МСК на 7 сутки после резекции происходило увеличение скорости сопряженного дыхания как в присутствии субстратов НАД-зависимых дегидрогеназ цикла Кребса, так и в присутствии субстрата комплекса bc1 (Рис. 51б). Также увеличивалась скорость сопряженного дыхания, стимулированного АДФ, в присутствии субстрата комплекса II и максимальная скорость несопряженного дыхания в присутствии субстрата комплекса II, ингибитора АТФазы олигомицина и разобщителя FCCP (Рис. 51б). При этом отношение скоростей сопряженного дыхания к максимальной скорости несопряженного дыхания, а также изменение скорости в ответ на добавление цитохрома c не менялось (данные не представлены); откуда

следует, что увеличение скорости дыхания не было связано с нарушением интактности митохондриальных мембран или индукцией разобщенного состояния митохондрий печени после субтотальной резекции.

Отношение количества фосфорилированного АДФ к количеству затраченного кислорода, являющееся показателем эффективности работы дыхательной цепи, в группе животных как с введением МСК, так и без трансплантации клеток не изменялось на 7 сутки после резекции (Рис. 52).

Данные о скорости митохондриального дыхания согласуются с полученными нами значениями содержания цитохромов в митохондриях. Цитохромы *b* и *aa3* входят в состав третьего и четвертого комплексов дыхательной цепи митохондрий. Цитохром *c* осуществляет перенос электрона с третьего на четвертый комплекс дыхательной цепи. Таким образом, одновременное увеличение количества цитохромов без изменения их соотношения, является свидетельством увеличения количества дыхательных цепей в митохондриях ткани печени в процессе регенерации. Это объясняет увеличение скорости дыхания в группе сравнения. В группе животных с трансплантацией МСК скорость дыхания, по-видимому, лимитируется на уровне дыхательного комплекса 4, в состав которого входит цитохром *aa3*.

Печень животных, которым трансплантировали МСК, по-видимому, уже прошла этап активного восстановления массы печени и перешла на стадию нормализации митохондриальной функции, при этом значение скорости сопряженного дыхания падало к 7 суткам до нормальных величин.

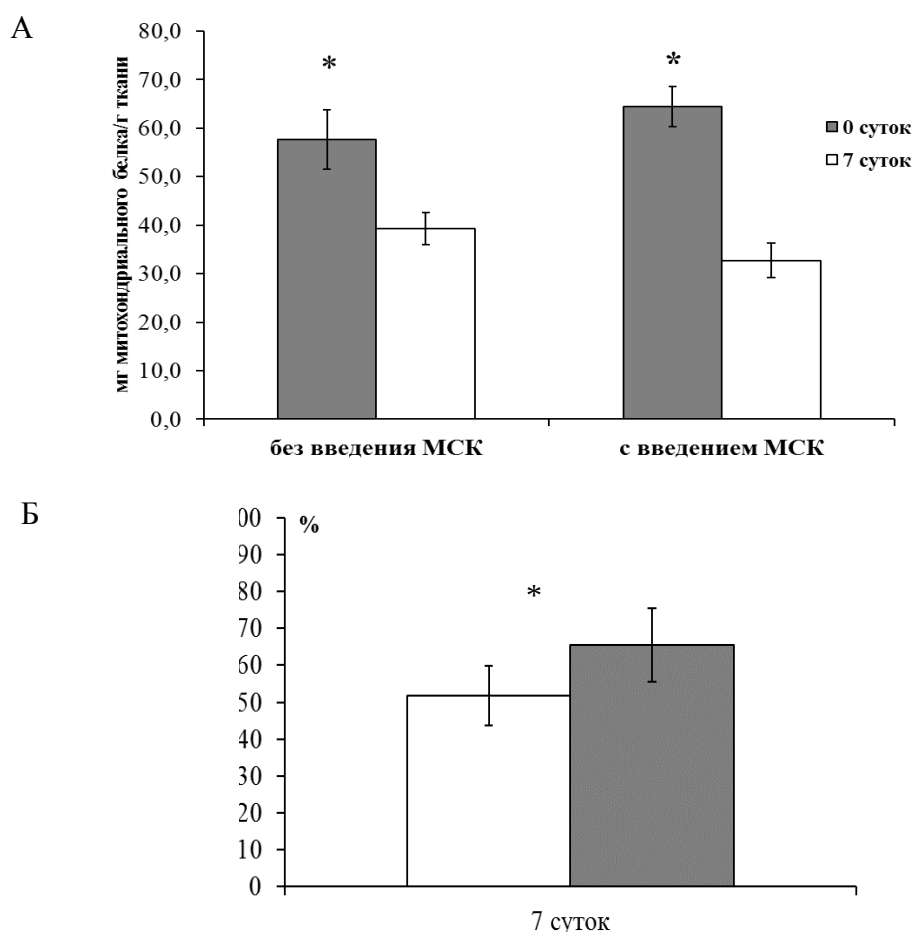


Рис. 48. Содержание митохондрий в ткани печени у крыс с трансплантацией МСК и без нее

А – содержание митохондриального белка на 1 г ткани печени; Б – количество митохондриального белка на 1 г ткани на 7 сутки после субтотальной резекции, % от исходного количества, данные представлены средние значения и стандартные ошибки средних, белые столбики – крысы без трансплантации МСК, серые столбики – животные, которым вводили внутриселезеночно МСК, * - статистически значимые различия по сравнению с соответствующим контролем, $p < 0,05$

Установлено, что после субтотальной резекции происходит снижение относительного содержания митохондрий на единицу массы печени, к 7 суткам удельное содержание митохондрий не восстанавливается, однако в печени крыс, которым трансплантировали МСК митохондрий было статистически значимо больше.

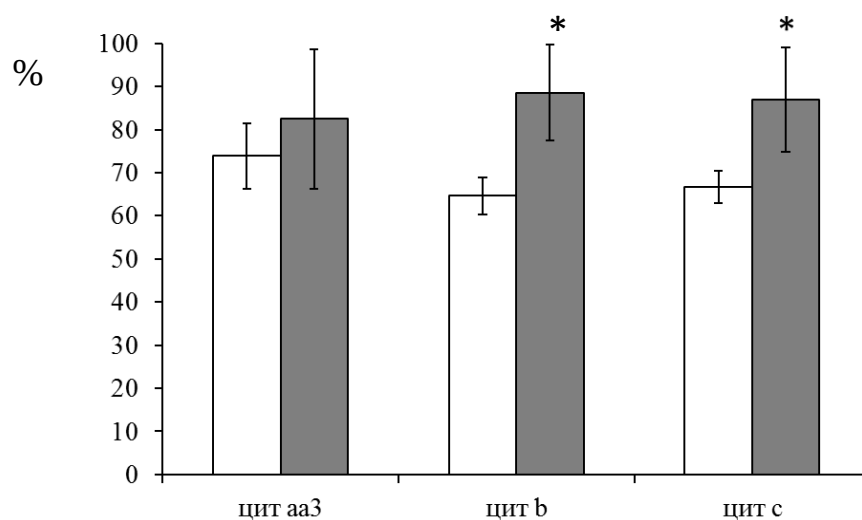


Рис. 49. Доля от исходного содержания цитохромов в 1 г ткани на 7 сутки после субтотальной резекции печени в сочетании без трансплантации МСК и с ней, белые столбики – крысы без трансплантации МСК, серые столбики – животные, которым вводили внутриселезеночно МСК. * - статистически значимые различия по сравнению с соответствующим контролем, $p < 0,05$

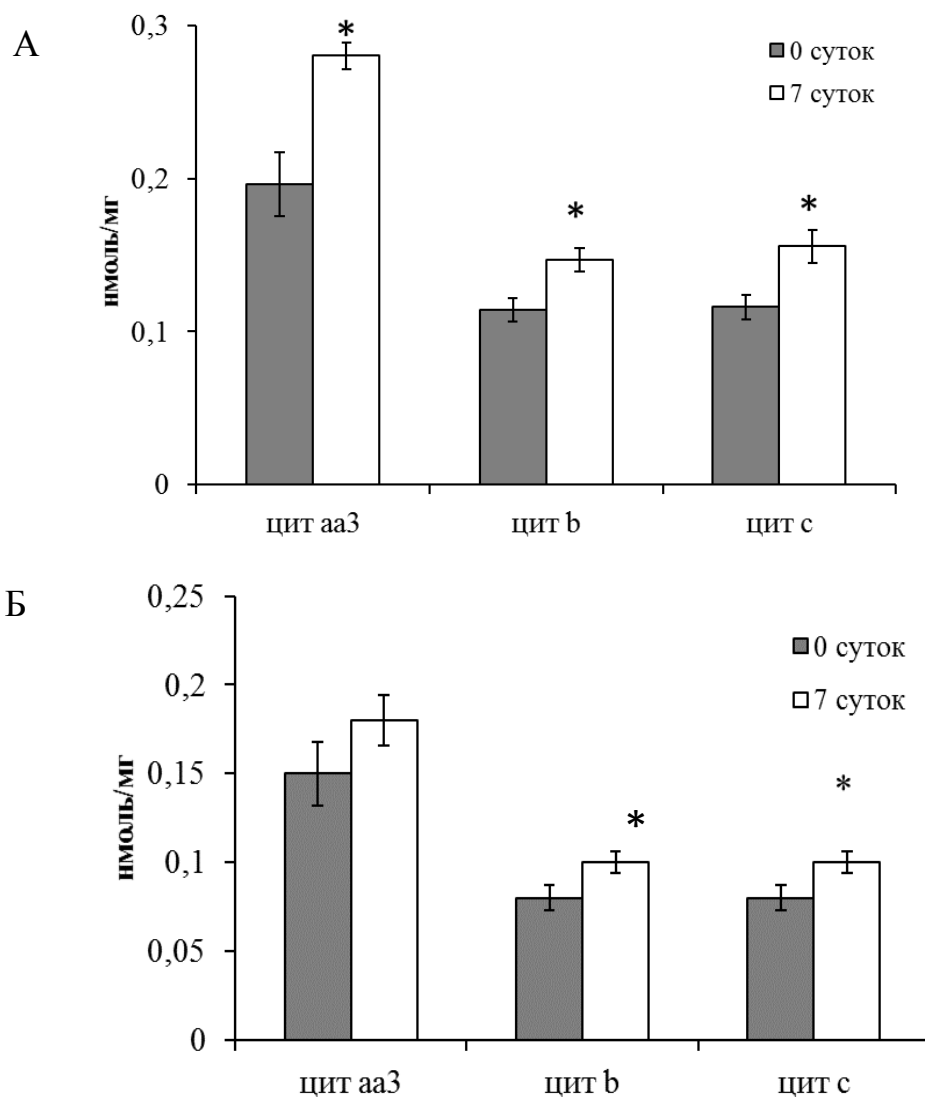


Рис. 50. А – содержание цитохромов с, в и aa3 в выделенных митохондриях печени контрольных крыс; Б - содержание цитохромов с, в и aa3 в выделенных митохондриях печени крысы после субтотальной резекции в сочетании с трансплантацией МСК; * - статистически значимые различия по сравнению с соответствующим контролем, $p < 0,05$

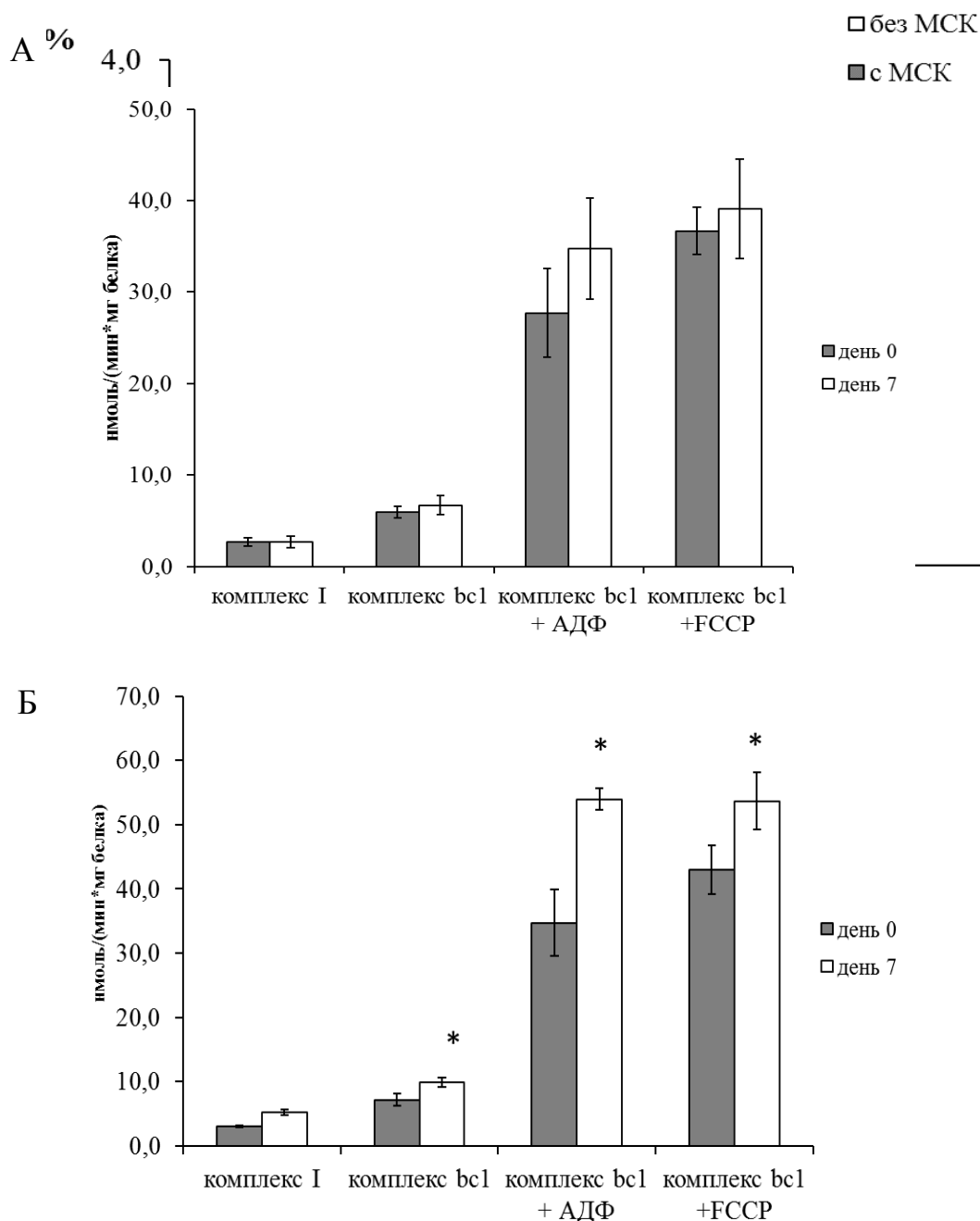


Рис.51. Содержание цитохромов аа3, b, c и скорость митохондриального дыхания в ткани печени.

А – скорость митохондриального дыхания в присутствии субстратов разных комплексов дыхательной цепи у животных с трансплантацией МСК, Б – в присутствии субстратов разных комплексов дыхательной цепи у животных без введения клеток: комплекс I – в присутствии глутамата и малата, bc1 комплекс – в присутствии сукцината на фоне ротенона, bc1 комплекс + АДФ – в присутствии сукцината и АДФ на фоне ротенона, bc1 комплекс + FCCP – в присутствии сукцината и FCCP на фоне ротенона и олигомицина; * – статистически значимое отличие от значения показателя соответствующей группы на 0 сутки или соответствующего контроля, $p < 0,05$.

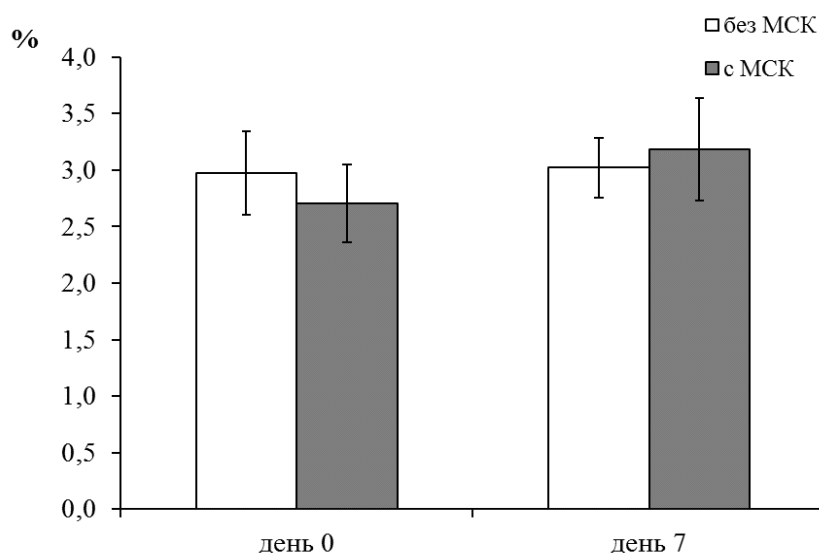


Рис. 52. Отношение количества фосфорилированного АДФ к количеству кислорода, затраченного на этот процесс у животных без введения клеток (1) и (2) с трансплантацией МСК; * – статистически значимое отличие от значения показателя соответствующей группы на 0 сутки или соответствующего контроля, $p < 0,05$.

Таким образом, на 7 сутки доля содержания цитохромов с и b от соответствующего значения в интактной печени была достоверно выше у животных с трансплантацией МСК относительно животных группы сравнения, при этом содержание цитохрома аа₃ на 7 сутки было повышено только у животных без введения МСК. Сравнение показателей скорости митохондриального дыхания клеток печени у животных после внутриселезеночной трансплантации МСК на 7 сутки после операции не выявил достоверных отличий от исходных показателей, у животных без введения МСК на 7 сутки после резекции происходило увеличение скорости сопряженного дыхания.

Исходя из полученных данных, было установлено, что интраспленальная аллогенная трансплантация МСК пупочного канатика

стимулирует восстановительные процессы в печени крысы после субтотальной резекции (80% массы органа). Введение МСК пупочного канатика увеличивало выживаемость животных и стимулировало пролиферацию гепатоцитов. Стимуляция репаративного процесса под действием МСК также выражалась в том, что у животных с трансплантацией клеток происходило более быстрое восстановление количества митохондрий в клетках печени и нормализация функционального состояния митохондриального аппарата гепатоцитов. При изучении механизмов стимулирующего влияния МСК пупочного канатика на репаративные процессы в печени крыс после субтотальной резекции мы обнаружили, что возможными посредниками влияния МСК являются макрофаги печени. Мы сделали такое предположение на основании данных, свидетельствующих о том, что после трансплантации МСК в печени уменьшается общее количество макрофагов, при этом увеличивается содержание так называемых прорегенераторных макрофагов. Такое представление о механизмах терапевтической активности различных МСК находит подтверждение в современной научной литературе [Proctor D.J., 2013], в соответствии с которой ведущим механизмом стимулирующего влияния МСК на репарацию органов и тканей является их способность регулировать процесс воспаление, в том числе посредством макрофагов. Однако при изучении экспрессии генов основных цитокинов, которые участвуют в воспалении и вызывают поляризацию макрофагов, мы не обнаружили разницу между животными с трансплантацией МСК и без таковой. Это может быть связано с наличием пока еще неизвестных молекулярных каскадов, посредством которых МСК могут влиять на поляризацию макрофагов.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

При изучении регенерации различных органов было предложено понятие критического повреждения. Нанесение такой травмы может изменять тип репаративного ответа, приводить к истощению компенсаторных возможностей и прекращению регенерации органа. Подобное явление описано для регенерации яичника, легких и других органов [Бабаева А.Г., 2009]. Наиболее подробно регенерация после критического дефекта изучена на модели повреждения плоских костей черепа млекопитающих, когда не происходит полного восстановления костного дефекта [Полежаев Л.В., 1977].

Явление сверхсильного повреждения описано и для печени. В трансплантологии и онкологии данное состояние рассматривается в рамках синдрома малого остатка органа, при котором объем пересаженной или оставшейся после резекции печень оказывается слишком маленькой для поддержания гомеостаза [Dahm F. et al., 2005]. Однако экспериментальные исследования регенерации печени после нанесения критического повреждения практически отсутствуют. Моделью для изучения влияния критической травмы на регенерацию печени может служить восстановление массы печени крыс после удаления 80% массы. Работ по изучение регенерации печени после субтотальной резекции проведено, крайне, мало.

Для выполнения субтотальной резекции у крыс необходимо удалить срединную, левую боковую и правую боковые доли печени. Данное повреждение может рассматриваться как критическое в связи с высокой смертностью лабораторных животных после такой операции. Смертность животных после субтотальной резекции достигала 50%, что соответствует данным других авторов [Романова

Л.К., 1984]. Наибольшая гибель оперированных крыс отмечалась в течение 2 суток после операции. Высокая смертность животных связана с развитием острой печеночной недостаточностью, что также подтверждается полученными данными, после субтотальной резекции на 3 сутки в крови животных отмечается достоверно сниженный уровень альбумина и повышение активности АЛТ.

Несмотря на тяжелую травму субтотальная резекция не препятствовала восстановлению массы печени. У выживших животных после операции постепенно увеличивалась масса печени, наибольшее интенсивно с 3 суток до 7 суток, полное восстановление массы печени происходило к 10 суткам после субтотальной резекции. При этом восстановление биохимических показателей крови подопытных животных происходило к 7 суткам после воздействия. Таким образом, регенерация печени крыс после субтотальной резекции завершается за 10 суток. Подобный срок регенерации печени примерно соответствует сроку восстановления массы печени после резекций меньших объемов и согласуется с данными других авторов [Ninomiya M. et al., 2010]. Так после 70% гепатэктомией масса печени крыс восстанавливается за 10-14 суток [Сидорова В.Ф., 1966]. Вероятно, причина того, что при разных объемах резекции масса печени восстанавливается примерно за одинаковые сроки, заключается в особенностях динамики пролиферации гепатоцитов, в сроках начала размножения гепатоцитов, наличия блоков и пиков пролиферации, длительности периода активной пролиферации после резекций разного объема.

Пролиферативная активность гепатоцитов регенерирующей печени изучалась путем подсчета митозов, а также с помощью иммуногистохимического маркера пролиферации Ki67.

Динамика митотического индекса гепатоцитов после удаления 80% тканей печени имеет несколько особенностей по сравнению с регенерацией после 70% резекции. В соответствии с литературными данными, первые митозы среди гепатоцитов после субтотальной резекции обнаруживаются только спустя 36 ч, что соответствует полученным данным. После частичной гепатэктомии (резекция 70% печени) у крыс первые митозы появляются через 12 ч после операции, а пик митотической активности наблюдается уже через 24ч [Сидорова В.Ф., Рябинина З.А., Лейкина Е.М., 1966]. Предполагается, что причиной своеобразной динамики митотического индекса гепатоцитов после удаления 80% массы печени является блок митотического цикла при переходе из G0 в G1, и при выходе клеток из G2-периода [Романова Л.К., 1984].

Данные по экспрессии Ki67 частично подтверждают наличие блока митотического цикла при переходе G0, поскольку через 24ч полностью отсутствовали гепатоциты, экспрессирующие Ki67, то есть гепатоциты, находящиеся в митотическом цикле (в G1-, S-, G2- и M-периодах). Единичные Ki67+ гепатоциты появлялись только через 30 ч после субтотальной резекции. Эти же данные свидетельствуют об отсутствии митотического блока при переходе из G2-периода в митоз на раннем этапе регенерации, так как большое количество Ki67+, наблюдаемое через 48 ч после резекции, совпадало с резким увеличением количества митотически делящихся гепатоцитов. При наличии митотического блока при переходе из G2-периода в митоз наблюдалось бы накопление Ki67+ гепатоцитов при снижении митотического индекса. Подобное соотношение митотического индекса гепатоцитов и индекса Ki67 отмечалось через 5 суток после субтотальной резекции. В это срок наблюдалось довольно большое количество Ki67+ гепатоцитов, однако происходило резкое снижение

митотической активности. Митотический блок был временным, так как на сроках после 5 суток в первую очередь на 7 сутки после операции, митотическая активность снова увеличивалась.

Другой особенностью митотической активности гепатоцитов после субтотальной резекции, являлось наличие двух пиков митотического индекса: большего через 48-72 ч и меньшего через 7 суток после операции. Наличие пиков пролиферации свидетельствует о синхронизации размножения гепатоцитов и высокой активности пролиферации [Lambotte L. et al., 1997]. После частичной гепатэктомии также наблюдают два пика пролиферации гепатоцитов, которые, однако, отмечены в течение первых двух суток после операции [Bucher N.R., Swaffield M.N., 1964].

Кроме того, несмотря на восстановление массы печени к 10 суткам после операции, наблюдались единичные митозы среди гепатоцитов на этом сроке, что свидетельствует о продолжающемся морфогенезе, в том числе о полиплоидизации гепатоцитов [Рябинина З.А., 1973].

В работе были изучены молекулярные механизмы, регулирующие пролиферацию гепатоцитов при регенерации печени. Обнаружено, что в зависимости от реакции на субтотальную резекцию все рассматриваемые гены можно разделить на три группы. Первая группа объединяет гены, экспрессия которых достоверно повышалась по сравнению с контролем в ранний период (3-48ч) регенерации печени после выполняемой операции. К этим генам относятся *il6*, *il10*, *inos*, *mmp9*, *fgf2*, *tgfb*, *fn14*, *sox9*. Ко второй группе генов, экспрессия которых статистически значимо повышалась на поздних сроках регенерации (5-10 сутки), относятся *illb*, *tnfa*, *tweak*, *inos*, *hgf*. В третью группу вошли гены, которые реагировали на субтотальную резекцию исключительно достоверным снижением

экспрессии в тот или иной период регенерации, к этим генам относятся *ang*, *vegf*, *sdfa*.

Таким образом, было выявлено две фазы повышенной экспрессии генов: ранняя фаза – в течение через 3-48 ч после резекции, и поздняя – в течение 5-10 суток. Результаты исследований других авторов по экспрессии генов после субтотальной резекции печени противоречивы. В некоторых работах отмечается повышение экспрессии *hgf*, *tgfb* и других генов только в течение первых 2-3 суток регенерации печени [Sowa J.-P. et al., 2008]. В ряде других исследованиях обнаружена повышенная экспрессия генов на протяжении всего периода регенерации печени, вплоть до 14 суток после операции [Scotté M. et al., 1997, Panis Y., et al., 1998, Mason S., et al., 1999].

Наличие двух фаз повышенной экспрессии генов при регенерации печени крыс после субтотальной резекции может быть связано с общей продолжительностью фазы пролиферации гепатоцитов, а также с наличием двух волн митотического индекса гепатоцитов. Как отмечалось выше, пролиферация гепатоцитов продолжалась практически на протяжении всего периода восстановления массы, что отличает субтотальную резекцию от операций меньшего объема, при которых активное митотическое размножение гепатоцитов наблюдалось только 2-3 суток после повреждения [Michalopoulos G.K., 2014].

Различия в наборе генов, экспрессия которых повышается в раннюю или позднюю фазу регенерации определяется несколькими причинами. Во-первых, для раннего периода регенерации печени характерно повышение экспрессии генов острой фазы, которые регулируют вступление гепатоцитов в митотический цикл - *il1b*, *il6*, *il10*, и тесно связанных с ними - *mmp9* [Knittel T. et al., 2000, Fausto

N., 2006], что согласуется с полученными данными. Кроме того, на динамику экспрессии генов оказывает влияние наличие запаса фактора роста в печени или в других органах. В таком случае экспрессия гена данного фактора будет повышаться только после истощения депо. Это характерно для HGF, который является главным митогеном гепатоцитов при регенерации печени, а также для FGF2 и TGFb, которые также влияют на пролиферацию гепатоцитов [Michalopoulos G.K., 2014]. TGFb является фактором роста, останавливающий пролиферацию гепатоцитов при регенерации печени, FGF2 является слабым митогеном для гепатоцитов и эндотелиоцитов [Fausto N., 2006, Michalopoulos G.K., 2014]. Несмотря на это увеличение экспрессии *hgf* в печени в ранний период после субтотальной резекции не было выявлено. Запасы FGF2 и TGFb в самой печени невелики, то есть следует ожидать активации экспрессии гена указанных факторов роста уже на раннем этапе восстановления печени, что и было подтверждено с помощью ПЦР-РВ.

Наличие двух фаз с повышенной экспрессией генов в какой-то мере объясняет наличие двух волн пролиферации гепатоцитов. Остается непонятным, почему после субтотальной резекции печени у крыс происходит задержка вступления гепатоцитов в пролиферацию (блок при переходе из G0-периода). Известно, что вступление гепатоцитов в митотический цикл регулируется рядом факторов: выход из G0-периода осуществляется под влиянием TNFa и IL6, прохождение фаз митотического цикла осуществляется под влиянием факторов роста, прежде всего, HGF, а выход из митотического цикла - под влиянием TGFb [Michalopoulos G.K., 2014]. Таким образом, для успешного вступления гепатоцитов в митоз важна определенная

последовательность с которой будут влиять биологически активные вещества.

Набор генов в первой фазе повышенной экспрессии генов может объяснить позднее вступление гепатоцитов в пролиферацию. Задержка начала пролиферации могла происходить вследствие сниженной экспрессии цитокинов, прежде всего $TNF\alpha$ и интерлейкина $IL6$, которые стимулирует вступление гепатоцитов в митотический цикл, а также синтеза HGF, который является главным митогеном для гепатоцитов [Michalopoulos G.K., De Frances M.C., 1997, Fausto N., 2000]. Другой причиной может служить повышенный синтез $TGF\beta$, который обладает антипролиферативной активностью [Michalopoulos G.K., 2014].

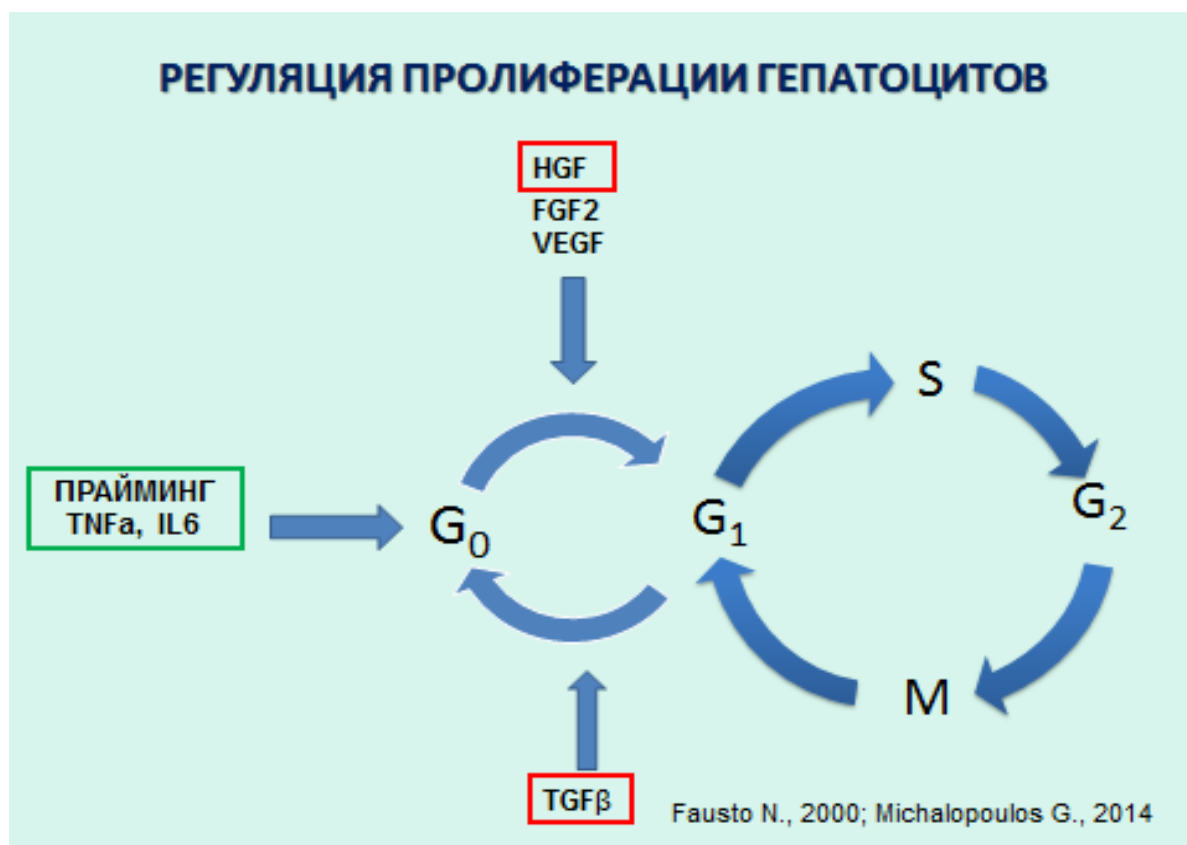


Рис. 53. Регуляция пролиферация гепатоцитов.

Нарушения экспрессии гена *il6* не выявлено. Статистически значимое повышение активности гена *il6* отмечалось в ранний послеоперационный период - через 3 и 6 ч после субтотальной резекции.

На ранних сроках после субтотальной резекции отсутствовало повышение экспрессии гена фактора некроза опухолей α - *tnfa*, который участвует в инициации пролиферации гепатоцитов и гена фактора роста гепатоцитов *hgf*, который является главным митогеном в печени. При этом на протяжении всего регенераторного процесса количество TNF α и HGF в печени было достоверно снижено по сравнению с контролем.

В ткани интактной печени содержится большое количество HGF. После удаления 70% массы печени через 3 часа после операции также наблюдается снижение концентрации HGF в печени, однако его содержание быстро восстанавливается к 72 часам после повреждения [Michalopoulos G.K., De Frances M.C., 1997], чего не наблюдалось после субтотальной резекции. Уменьшение содержания HGF в печени происходит по 2-м причинам: утилизации данного фактора гепатоцитами, которые связывают его с помощью рецепторов к HGF, и секреции HGF в кровь [Pediaditakis P. et al., 2001]. При субтотальной резекции вместе с тканями печени, видимо, удалялось большое количество HGF, вследствие чего концентрация HGF в крови оказывается недостаточной для стимуляции пролиферации гепатоцитов на раннем этапе регенерационного процесса, что приводит к временному блоку митотического цикла.

Нарушения экспрессии гена *tgfb* и резкого повышения содержания TGF β в печени после субтотальной резекции не выявлено. Экспрессия гена *tgfb* увеличивалась через 6 ч после субтотальной резекции. При изучении содержания белка TGF β в

регенерирующей печени крыс после субтотальной резекции методом вестерн-блот установлено, что TGF β практически полностью исчезает из печени после субтотальной резекции, его содержание восстанавливается в тканях лишь к окончанию регенерационного процесса к 7-10 суткам. Полученные данные согласуются с данными других авторов, полученными на модели регенерации печени после 70% резекции [Michalopoulos G.K., 2010].

Обращает на себя внимание совпадение периода наибольшей активности пролиферации гепатоцитов с периодом низкого содержания TGF β в регенерирующей после субтотальной резекции печени крыс. Такая динамика TGF β связана, видимо, с его функцией ингибитора пролиферации, то есть регенерация печени возможна только в условиях отсутствия в ней самой TGF β [Fausto N., 2006, Michalopoulos G.K., 2014]. По мере завершения репаративного процесса уровень TGF β в печени восстанавливается. Остается неясным, почему, несмотря на способность ингибировать пролиферацию, экспрессия *tgfb* и синтез TGF β активизируется еще во время активной пролиферации гепатоцитов. Возможно, что во время активного митотического размножения гепатоциты резистентны к влиянию TGF β [Fausto N. et al., 2006, Michalopoulos G.K., 2014].

Таким образом, исходя из полученных данных, митотический блок гепатоцитов в течение 30 ч после субтотальной резекции у крыс был связан с низким содержанием TNF α и HGF в печени.

Помимо генов с повышенной экспрессией мы обнаружили, что гены *vegfa*, *sdf1a*, *ang* на всем протяжении регенерационного процесса экспрессировались в оперированной печени на более низком уровне, чем у интактных животных. VEGF и ангиогенин стимулируют пролиферацию эндотелиоцитов в ходе регенерации печени [Leve L.D., 2013], а SDF α вызывает миграцию клеток красного костного

мозга в печени при различных повреждениях [Dalgetty D.M. et al., 2009]. Возможно, снижение экспрессии генов указанных факторов в печени происходит за счет, повышенного их синтеза в других органах, а также за счет того, что активно экспрессирующиеся факторы роста при данном виде повреждения берут на себя роль других факторов роста.

Большинство изученных генов, в том числе и те, у которых удалось обнаружить повышенную экспрессию, на некоторых сроках после операции экспрессировались с меньшей активностью по сравнению с контролем. Так мы обнаружили сниженную экспрессию *tweak* в период 6-24 ч, *tnfa* через 3 и 12 ч, *tgfb* и *il1b* через 12 ч, *hgf* через 24, 48 и 72 ч. На раннем этапе регенерации это, видимо, объясняется стрессовой реакцией печени на тяжелую травму, а на стадиях, следующих после повышенной экспрессии того или иного гена, разрушением большого количества мРНК с помощью микроРНК [Chen Y., Verfaillie C.M., 2014].

Неясно, почему не смотря на активное использование и низкое содержание HGF, не было увеличения экспрессии гена *hgf* в печени на ранних этапах регенерации. То есть синтез новых молекул HGF в печени, вероятно, не происходил вообще, либо происходил на низком уровне. Это могло наблюдаться в случае, если в печень из других органов с кровью поступает большое количество HGF и синтезировать собственный HGF нет необходимости.

Это подтверждается обнаруженной экспрессией гена *hgf* и других факторов, регулирующих пролиферацию гепатоцитов в легких и почках в ранние сроки после субтотальной резекции печени. При этом в легких происходило постепенное нарастание количества белка HGF, тогда как в почках - резкое нарастание HGF к 6 ч, а потом резкое снижение, что свидетельствует о его поступлении в кровь. Исходя из этого, возможно,

значительная часть HGF, необходимая для пролиферации гепатоцитов, образовывалась за пределами печени. Время, которое предшествовало появлению пролиферирующих гепатоцитов уходило на синтез, активацию и выделение HGF в кровь из других органов, в том числе из печени и легких, что согласуется с нашими и данными литературы [Yanagita K. et al., 1992, Kono S. et al., 1992].

В ходе регенерационного процесса острая печеночная недостаточность постепенно компенсировалась, потребность в HGF снижалась, и индукция его синтеза в легких и почках прекращалась. Поскольку поступление экзогенного для печени HGF прекращалось, а депо HGF в печени было истощено, происходила индукция экспрессии гена *hgf* уже в самой печени с последующим синтезом HGF. Таким образом, происходило восстановление запасов HGF в печени, что обнаружено к 10 суткам после субтотальной резекции печени крыс.

С другой стороны, в печени с 3 по 30 ч после субтотальной резекции обнаружено повышение экспрессии генов фактора роста фибробластов 2 - *fgf2*, который является слабым митогеном для гепатоцитов, и гена *fn14* – рецептора TWEAK-сигнального пути, который, видимо, также участвует в регуляции пролиферации гепатоцитов [Houck K.A. et al., 1990, Han S. et al., 2003, Karaca G. et al., 2014]. Полученные данные свидетельствуют о том, что, вероятно, при резком снижении HGF стимуляция пролиферации гепатоцитов может происходить за счет других факторов, в том числе FGF2 и TWEAK-сигнального пути.

Несмотря на позднее начало и наличие временных блоков митотического цикла, пролиферация гепатоцитов после субтотальной резекции протекает довольно интенсивно, на что указывает пиковое значение митотического индекса и индекса Ki67. Однако после

субтотальной резекции среди генов с повышенной экспрессией были обнаружены как классические гены, регулирующие пролиферацию гепатоцитов, так и гены, которые регулируют активность альтернативных путей регенерации печени – *sox9*, *fn14*, *tweak*.

Восстановление массы печени после 70% резекции происходит в основном за счет пролиферации гепатоцитов без участия незрелых клеток-предшественниц [Michalopoulos G.K. 2014]. Однако данное положение подвергается пересмотру, так как появились данные об активации прогениторных клеток даже после удаления 70% паренхимы печени [Furuyama K., 2011].

Роль прогениторных клеток в регенерации печени после субтотальной резекции (удаление 80% массы органа) не изучена. В данной работе показано, что после субтотальной резекции печени крыс пролиферация гепатоцитов оказывается временно заблокированной, что делает возможным участие резидентных недифференцированных клеток в регенерации печени.

В настоящее время продолжают изучаться альтернативные механизмы регенерации печени после резекции. Одни авторы предполагают наличие отдельного типа клеток-предшественниц гепатоцитов и холангиоцитов. Возможно, такими клетками являются овальные клетки, которые располагаются в составе терминальных холангиол (канальцы Геринга). Данные клетки экспрессируют маркеры холангиоцитов: цитокератин 19, panCK и другие, а также транскрипционный фактор SOX9 [Furuyama K. et al., 2011, Yanger K. et al., 2013]. Близким к описанному является представление, в соответствии с которым все холангиоциты рассматриваются в качестве факультативных прогениторных клеток печени. При повреждении билиарного эпителия часть клеток претерпевает репрограммирование, в результате чего, вероятно, появляются

овальные клетки [Rodrigo-Torres D. et al., 2014], которые далее способны дифференцироваться в гепатоциты. Следствием этих событий является сначала увеличение доли, клеток, которые экспрессируют маркеры холангиоцитов (цитокератин 19, panCK), что рассматривается как признак активации прогениторных клеток печени [Bird T.G. et al., 2013]. Далее появляются клетки, которые экспрессируют одновременно маркеры холангиоцитов (цитокератин 19, panCK) и гепатоцитов (альбумин, NHF4). При этом подчеркивается, что такие клетки должны располагаться не только в составе желчных протоков, но и за их пределами [Bird T.G. et al., 2013].

Другой альтернативный путь регенерации печени предполагает, что не только холангиоциты обладают выраженной пластичностью. Гепатоциты также в определенных условиях могут дифференцироваться в холангиоциты [Yanger K. et al., 2013, Yimlamai D. et al., 2014]. Наиболее часто подобный процесс наблюдают на экспериментальных моделях токсического повреждения печени и на модели холестаза при перевязке общего желчного протока. При этом в печени появляется сначала большое количество гепатоцитов, которые экспрессируют SOX9. Далее нарастает число клеток с фенотипом промежуточным между гепатоцитом и холангиоцитом, то есть появляются клетки, которые экспрессируют маркеры гепатоцитов например NHF4, альбумин и маркеры холангиоцитов CK19 [Yanger K. et al., 2013, Yimlamai D. et al., 2014]. Предполагается, что ведущую роль в регуляции репрограммирования гепатоцитов принадлежит NOTCH-сигналингу [Yanger K. et al., 2013, Yimlamai D. et al., 2014]. Таким образом, какой механизм регенерации печени будет задействован, зависит от тяжести и природы повреждения. Если заблокирована пролиферация

гепатоцитов, то в роли прогениторных клеток для гепатоцитов выступают холангиоциты или их производные, если блокирована способность к митозу у клеток билиарного эпителия, то наоборот, гепатоциты выступают в роли предшественников новых холангиоцитов.

После субтотальной резекции обнаружено статистически значимое увеличение доли CK19+ клеток в регенерирующей печени крыс. Однако такие клетки локализовались только в эпителии желчных протоков. При определении содержания белка CK19 методом вестерн-блот статистически значимых различий между контролем и опытом не выявлено. Таким образом, полученные данные свидетельствуют скорее о гиперплазии билиарного эпителия, нежели об активации прогениторных клеток печени [Zong Y. et al., 2009, Lefebvre V. et al., 2007]

Иной была картина при изучении экспрессии SOX9 после субтотальной резекции, были обнаружены SOX9+гепатоциты, наибольшее количество таких клеток определялось через 2 и 7 суток после операции, что подтверждается данными вестерн-блота. Подобная картина схожа с явлением репрограммирования гепатоцитов с последующей дифференцировкой в холангиоциты. Однако периоды резкого увеличения количества SOX9+ клеток сменялись сроками, когда SOX9 экспрессировался только в билиарном эпителии, при этом в такие периоды отсутствовало накопление каких-либо клеток с промежуточным фенотипом. Это также подтверждается данными по экспрессии CK19. Большинство CK19+клеток имели типичную для холангиоцитов морфологию и располагались в составе желчных протоков.

SOX9 является транскрипционным фактором, который играет важную роль в гистогенезе ряда тканей млекопитающих [Lefebvre V.

et al., 2007]. В постнатальном периоде онтогенеза SOX9 экспрессируется многими малодифференцированными клетками, например, сперматогониями, эпителиоцитами дна кишечных крипт и др., поэтому SOX9 рассматривают как маркер прогениторных клеток [Furuyama K. et al., 2011]. При этом считают, что SOX9 участвует в поддержании клетки в малодифференцированном состоянии [Lefebvre V. et al., 2007].

Обращает на себя внимание совпадение пиков митотического индекса гепатоцитов и времени, когда в регенерирующей печени обнаружено наибольшее количество гепатоцитов, экспрессирующих SOX9. Хорошо известно, что гепатоциты перед вступлением в митотический цикл претерпевают некоторую дедифференцировку и начинают экспрессировать ряд маркеров гепатобластов, например, α -фетопроtein [Michalopoulos G.K., De Frances M.C., 1997]. Возможно, экспрессия SOX9 в гепатоцитах отражает их подготовку к пролиферации и более глубокую дедифференцировку после субтотальной резекции по сравнению с резекцией печени меньшего объема.

Роль SOX9 в пролиферации показана на линии клеток легочной аденокарциномы A549. Обнаружено, что при трансфекции геном *sox9* клеток данной линии у них *in vitro* повышается пролиферация и способность к миграции и инвазии [Wang X. Et al., 2015]. Вероятно, дедифференцировкой гепатоцитов перед вступлением в митотический цикл объясняется и увеличение экспрессии гена *hes1*, который также участвует в поддержании недифференцированного состояния клеткой [Kageyama R. et al., 2008, Antoniou A., 2009].

Изучению роли NOTCH-сигнального пути при развитии печени млекопитающих посвящено множество работ, в которых показано ключевая роль данного молекулярного каскада в дифференцировке холангиоцитов [Zong Y. et al., 2009, Jeliazkova P. et al., 2013]. Участие NOTCH-сигнального пути в репарации печени посвящено

значительно меньше работ, которые, прежде всего, касаются восстановительных процессов при токсическом повреждении печени [Yanger K. et al., 2013]. В данных работах получены доказательства возможности трансдифференцировки гепатоцитов в направлении холангиоцитов и ключевой роли активации NOTCH-сигнального пути и связанных с ним генов в данном процессе. Значительно меньше работ касается участия генов NOTCH-сигнального пути в регенерации печени после резекции. После субтотальной резекции (удаление 80% тканей печени) происходило подавление активности NOTCH-сигналинга при регенерации печени крыс, что свидетельствует об отсутствии активации альтернативных путей регенерации печени. При этом сниженная экспрессия *notch1* предшествовала активной пролиферации гепатоцитов, а подавление *notch2* совпадало по времени с периодом наибольшей митотической активности гепатоцитов. Таким образом, полученные данные согласуются с работами, в которых показано, что активация пролиферации гепатоцитов возможна только в условиях подавленной активности NOTCH-сигналинга [Köhler C. et al., 2004, Croquelois A. et al., 2005]. Не смотря на подавление генов *notch1* и *notch2* в печени после субтотальной резекции, было обнаружено повышение экспрессии NOTCH-зависимых генов *hes1* и *sox9*. Возможно, что это связано с тем, что ген *sox9* является не только NOTCH-зависимым, но также Wnt-зависимым, кроме того, его экспрессия повышается под влиянием TGFb, FGF10 [Jeliazkova P. et al., 2013, Kawaguchi Y.J., 2013]. В свою очередь, показано, что активация гена *sox9* вызывает увеличение экспрессии *hes1* [Kawaguchi Y.J., 2013]. Роль генов *sox9* и *hes1* в поддержании недифференцированного состояния и в пролиферации обсуждалась выше.

Помимо NOTCH-сигнального пути в активации прогениторных клеток печени в соответствии с данными литературы играет Fn14/TWEAK-сигнальный путь [Yimlamai D. et al., 2014]. Обнаружено статистически значимое повышение экспрессии гена *tweak* и особенно *fn14* в печени после субтотальной резекции.

Fn14 в печени контрольных животных слабо экспрессировался в холангиоцитах и гепатоцитах. Однако через 1 сутки после субтотальной резекции печени крыс в гепатоцитах усиливалась экспрессия Fn14. Наибольшая экспрессия Fn14 отмечалась через 2-3 суток после субтотальной резекции, к 7 и 10 суткам после операции активность экспрессии возвращалась к контрольному уровню. Полученные данные об интенсивной экспрессии белка Fn14 гепатоцитами, а также совпадение сроков наибольшей экспрессии Fn14 с пиком пролиферации гепатоцитов подтверждают данные о важной роли Fn14/TWEAK-сигнального пути не только в активации прогениторных клеток печени, но и в митотическом размножении гепатоцитов [Han S. et al., 2003, Karaca G. et al., 2014].

Пролиферация гепатоцитов при регенерации печени млекопитающих регулируется множеством факторов роста и активных молекул, что создает устойчивую систему [Michalopoulos G.K. 2011]. В случае инактивации одного регуляторного каскада включается другой, дублирующий, что позволяет запустить репаративные процессы в органе даже при тяжелых травмах. Получены данные, которые свидетельствуют о возможных нарушениях пролиферации гепатоцитов связанных с низким содержанием TNFa и HGF у подопытных животных. Возможно, одним из запасных регуляторных каскадов для репарации печени является Fn14/TWEAK-сигнальный путь, который активируется только в условиях сверхсильных повреждений и может регулировать

как активацию прогениторных клеток, так и размножение гепатоцитов.

Таким образом, несмотря на обнаружение экспрессии маркеров незрелых клеток в печени после субтотальной резекции не удалось обнаружить активации альтернативных путей регенерации печени (активации прогениторных клеток, трансдифференцировки гепатоцитов). Главным механизмом восстановления массы печени является пролиферация гепатоцитов.

Среди генов, чья экспрессия, повышалась после субтотальной резекции печени у крыс, большинство являются генами макрофагов (*il1b*, *il6*, *il10*, *tnfa*, *tweak*), что указывает на ключевую роль данной популяции клеток в координации регенерации печени [Fausto N. et al., 2006].

Макрофаги представляют многочисленную клеточную популяцию печени. Примерно 20% ядер в поле зрения принадлежало CD68+клеткам. Субтотальная резекция вызывала активацию макрофагов печени, что выражалось в увеличении количества CD68+ клеток. После резекции 80% паренхимы печени крыс, количество CD68+ клеток статистически значимо нарастало через 1 сут после резекции и оставалось повышенным по сравнению с контролем до 10 суток после операции включительно.

Макрофаги печени представляют собой гетерогенную популяцию клеток. В нормальном состоянии большинство макрофагов печени представлено резидентными клетками Купфера, меньшая часть представлена макрофагами, потомками моноцитов крови [You Q. et al., 2013, Zigmond E. et al., 2014]. Макрофаги моноцитарного происхождения экспрессируют на своей поверхности CX3CR1 и Ly6C (обнаружен только у мышей), в то время как у клеток Купфера данные поверхностные молекулы отсутствуют [You Q. et al., 2013, Zigmond E. et al., 2014]. При регенерации печени после повреждения различной природы показано, что в начале регенераторного

процесса в паренхиме печени мигрируют макрофаги, производные моноцитов крови, на поздних стадиях в печени нарастает количество резидентных макрофагов (клетки Купфера) [You Q. et al., 2013, Zigmond E. et al., 2014]. При этом если предотвратить проникновение в печень моноцитов крови, то наблюдается замедление регенераторного процесса в данном органе [You Q. et al., 2013, Zigmond E. et al., 2014].

То есть увеличение общего количества макрофагов печени могло происходить двумя путями: как за счет пролиферации резидентных макрофагов в оставшихся долях печени, так и за счет инфильтрации моноцитами крови в ответ на повреждение. Однако после субтотальной резекции все макрофаги печени у крыс относились к популяции резидентных, поскольку ни на одном из сроков после субтотальной резекции печени не обнаружено клеток, экспрессирующих белок CX3CR1, который является маркером макрофагов, производных моноцитов крови. Это отличает репаративный процесс в печени после резекции от восстановления после токсического повреждения с помощью CCL4, парацетамола и др., когда ткани печени инфильтрируются моноцитами крови [You Q. et al., 2013, Zigmond E. et al., 2014].

Сведения о динамике пролиферации макрофагов печени после субтотальной резекции в научной литературе отсутствуют. Имеются лишь данные, что после резекции 70% паренхимы печени пик митотического размножения макрофагов наблюдается через 48 часов [Michalopoulos G.K., De Frances M.C., 1997]. Мы также обнаружили митотически делящиеся макрофаги в печени крыс после субтотальной резекции только через 48 часов после операции, митотический индекс равен $4,5 \pm 1,8\%$. Ни на более ранних сроках, ни на более поздних митозы среди макрофагов не встречались.

Помимо разных источников происхождения, активированные макрофаги могут различаться по своим свойствам. Различают классические M1 – провоспалительные макрофаги, характеризующиеся секрецией Il1b,

IL6, TNF α , и альтернативные M2 – прорегенераторные макрофаги, характеризующийся секрецией IL-10 [Martinez F.O., Gordon S., 2014]. В общих чертах, на начальных этапах репаративных процессов происходит увеличение M1 макрофагов, а на завершающей стадии M2 [Chazaud B., 2014].

Как соотносятся макрофаги из разных источников происхождения с функциональными типами активированных макрофагов (M1 и M2) в ходе репаративных процессов в печени остается малоизученным [Chazaud B., 2014]. На модели регенерации печени после острого повреждения ацетаминофеном показано, что на ранней стадии повреждения в печени увеличивается количество макрофагов, производных моноцитов крови, и уменьшается доля резидентных клеток Купфера, количество которых восстанавливается на поздней стадии репаративного процесса [You Q. et al., 2013, Zigmond E. et al., 2014]. Подобная динамика клеток Купфера печени напоминает динамику M2 макрофагов при остром и хроническом повреждении печени CCl₄ и другими токсическими веществами, когда в печени на начальных этапах репаративного процесса нарастает количество провоспалительных M1 макрофагов, а на заключительных этапах происходит поляризация популяции макрофагов в направлении увеличения доли прорегенераторных M2 макрофагов [Novak M.L. et al., 2013]. Данные о динамике количества прорегенераторных M2-макрофагов в ходе восстановления массы печени после резекции различных объемов отсутствуют.

Особенности экспрессии были выявлены как среди генов, характерных для M1-, так и M2-макрофагов. Вместо экспрессии на ранних стадиях регенерации ген *il1b* и *tnfa* активизировались на позднем этапе восстановительного процесса, а ген *inos* экспрессировался в течение всего репаративного процесса. Ген *il6*, характерный преимущественно для M1 макрофагов, экспрессировался в раннем периоде восстановления печени после

субтотальной резекции, что согласуется с литературными данными [Michalopoulos G.K., 2014, Martinez F.O., Gordon S., 2014].

Роль регенерации печени IL1b в настоящее время активно изучается, показано, что данный цитокин подавляет пролиферацию гепатоцитов и, таким образом, вместе с TGFβ приводят к завершению восстановительных процессов в печени [Yin S. et al., 2011].

Одними из главных маркеров M1 активированных макрофагов являются TNFα и IL6, которые в соответствии с данными литературы образуют регуляторную систему, стимулирующую в гепатоците экспрессию так называемых генов раннего ответа, что приводит к вступлению клетки в митотический цикл [Fausto N. et al., 2006]. Помимо прочего, показано, что TNFα/IL6 стимулируют образование iNOS, которая вместе с NO защищает гепатоциты от высокого уровня TNFα/IL6 [Rai R.M. et al., 1998]. Кроме того, в настоящее время появились данные о том, что IL6 индуцирует синтез HGF [Coudriet G.M. et al., 2010].

По мнению ряда авторов, тяжесть субтотальной резекции и высокая смертность подопытных животных связана с выраженным уровнем апоптоза гепатоцитов [Sowa J.P. et al 2008, Eshkenazy R. et al., 2014], вызванным избыточной синтезом TNFα [Tian Y. et al., 2006].

При изучении содержания TNFα методом вестерн-блот в регенерирующей печени крыс, показано, что данный цитокин после субтотальной резекции практически полностью исчезает, а экспрессия гена *tnfa* повышается только в конце регенерации. Возможно, что таким образом осуществляется защита пролиферирующих гепатоцитов от апоптотической гибели, индуктором которой в печени является TNFα [Fausto N. et al., 2006]. С этим согласуются данные, полученные с помощью метода TUNEL и

изучения экспрессии каспазы 3, и свидетельствующие о низкой активности клеточной гибели в печени после субтотальной резекции.

Особенности экспрессии были характерны и для маркеров M2 активированных макрофагов. Так на самых ранних этапах регенерации печени крыс после субтотальной резекции происходило увеличение экспрессии гена *il10*, а также увеличение количества макрофагов, экспрессирующих на своей поверхности маркер CD206. Подобная динамика экспрессии *il10* была обнаружена при репаративном процессе после острого повреждения печени CCl₄ [Novak M.L. et al., 2013].

Роль цитокинов в регенерации печени после резекции заключается в регуляции пролиферации гепатоцитов [Fausto N. et al., 2006, Michalopoulos G.K., 2014]. В связи с этим, возможно, ранняя экспрессия маркеров M2 макрофагов, обусловлена тем, что в печени после резекции отсутствует выраженная альтеративная фаза воспаления, в связи с чем фаза пролиферации начинается значительно раньше, чем при репарации других органов. На это косвенно указывает совпадение периода наибольшего количества CD206+макрофагов в регенерирующей печени с наибольшей пролиферативной активностью гепатоцитов в печени крыс после субтотальной резекции. Кроме того, экстремально большой объем резецируемой ткани печени (80% паренхимы) потребовал длительной пролиферации гепатоцитов, что также возможно сказалось на динамике экспрессии генов цитокинов.

Одновременное повышение экспрессии генов про- и противовоспалительных цитокинов, а также нехарактерное для других органов раннее и продолжительное увеличение количества клеток, экспрессирующих маркер M2 макрофагов CD206 позволяет предположить, что при регенерации печени после субтотальной резекции отсутствует поляризация макрофагов по стадиям репаративного процесса. Источником образования M2 макрофагов после субтотальной резекции были только

резидентные макрофаги печени, поскольку в печени отсутствовали макрофаги костномозгового происхождения, экспрессирующие CX3CR.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что субтотальная резекция действительно является критической травмой для печени. При этом нанесение такого повреждения принципиально не препятствует регенерации печени. Однако после субтотальной резекции в печени наблюдается нарушение пролиферации гепатоцитов, которое, видимо, связано с особенностями экспрессии TNF α и HGF и других регуляторов регенерации.

Нарушение пролиферации гепатоцитов в раннем послеоперационном периоде снижает скорость увеличения числа гепатоцитов, что видимо критически сказывается на состоянии организма подопытных животных, утяжеляя выраженную острую печеночную недостаточность. Исходя из этого, мы предположили, что именно дезорганизация митотического размножения паренхиматозных клеток является тем дополнительным фактором отягощающим течение регенерационного процесса, приводящая к резкому увеличению смертности подопытных животных после субтотальной резекции.

Показано, что после различного вида повреждений в регенерации печени принимают участие стромальные клетки-предшественницы, мигрирующие в печень из разных органов и стимулирующие репаративные процессы [Chistiakov D.A., 2012, Ma H.C. et al., 2014]. Наибольшей активностью стимулировать репарацию печени обладают МСК Вартонова студня [Wu X.-B., Tao R., 2012].

Способность МСК мигрировать в область повреждения рассматривают как одно из ключевых свойств МСК, которое позволяет использовать данный вид клеток в терапевтических целях [Chen F.-M. et al., 2011]. По мнению многих исследователей, наиболее приемлемым способом трансплантации МСК с целью стимуляции регенерации печени является введение клеток в

селезенку, что связано, прежде всего, с общностью кровотока двух органов [Li J. et al., 2011]. Меченые МСК после трансплантации обнаруживали в селезенке на всех сроках исследования. Непосредственно после введения визуализировали треки введения – скопления меченых клеток в местах инъекций, далее меченые МСК обнаруживали преимущественно в красной пульпе селезенки, где они располагались диффузно, единичные клетки можно было видеть в белой пульпе.

МСК после трансплантации в селезенку способны мигрировать в печень, но в очень ограниченном количестве. Наибольшее число меченых клеток в печени выявили через 7 суток после трансплантации, при этом клетки располагались группами от 1 до 4. Постепенно происходило снижение числа мигрирующих клеток, видимо, вследствие завершения восстановительного процесса в печени. Другой причиной уменьшения числа меченых клеток в печени может быть постепенная элиминация трансплантированных клеток.

Установлено, что трансплантация МСК пупочного канатика приводила к увеличению выживаемости подопытных животных. В группе животных с введением МСК пупочного канатика количество особей, выживших после субтотальной гепатэктомии, было статистически значимо больше примерно на 30%, чем в группе сравнения. При этом разницы в скорости восстановления массы печени после субтотальной резекции у животных разных экспериментальных групп не выявлено.

Несмотря на одинаковую скорость восстановления массы печени, трансплантация МСК стимулировала пролиферацию гепатоцитов, что согласуется с результатами других исследований [Li Q. et al., 2013]. Возможно, именно стимуляция пролиферации гепатоцитов в раннем послеоперационном периоде явилась тем механизмом, который привел к увеличению выживаемости.

Авторы, которые получили данные о способности МСК стимулировать репаративные процессы в печени, предполагают несколько механизмов такого влияния. На модели фиброза печени после инъекций CCl₄, было показано, что МСК, полученные из красного костного мозга, и введенные внутривенно мигрировали в печень и вызывали увеличение пролиферации гепатоцитов. Предполагается, что стимулирование регенерации печени происходило за счет паракринного механизма, поскольку было обнаружено увеличение содержаний HGF и других факторов роста в печени [Li Q. et al., 2013]. В другой работе использовали модель регенерации печени крыс после субтотальной резекции, при этом трансплантацию инкапсулированных МСК осуществляли в селезенку. Предполагается, что в данном случае МСК дифференцировались в направлении гепатоцитов [Liu Z.C. et al., 2012; Wu X.-B., R. Tao, 2012].

С помощью иммуногистохимических маркеров исследована возможность дифференцировки МСК в направлении гепатоцитов и холангиоцитов, после субтотальной резекции. Полученные данные, свидетельствуют о том, что трансплантированные МСК пупочного канатика не экспрессируют цитокератин 18 и 19. Изучена способность МСК дифференцироваться в клетки стромы. Обнаружено, что введенные клетки не экспрессировали α -гладкомышечный актин, то есть не дифференцировались в гладкие миоциты или миофибробласты. Однако на 3 и 10 сутки были обнаружены единичные клетки, меченные PKH26, и несущие маркер эндотелиоцитов CD31. Способность МСК пупочного канатика крыс к дифференцировке в направлении эндотелиоцитов подтверждена *in vitro*. Полученные МСК пупочного канатика крыс при сокультивировании с культурой эндотелиальных клеток в матрикеле способны экспрессировать CD31, что согласуется с литературными данными. Известно, что эндотелиальную дифференцировку МСК стимулирует VEGF и контакт с матриксом эндотелиальных клеток, под действием которых МСК начинают

экспрессировать маркеры эндотелия [Oswald J. et al., 2004, Lozito T.P. et al., 2009]. При этом МСК пупочного канатика лучше отвечают на индукцию эндотелиальной дифференцировки, чем МСК костного мозга используемые в большинстве подобных исследований [Chen M.Y. et al., 2009].

Для МСК продемонстрирована способность стимулировать ангиогенез в поврежденных органах [Wang L. et al., 2012, Pacini S., Petrini I., 2014]. Предполагается, что МСК способствуют образованию новых сосудов в основном за счет выделения проангиогенных факторов [Watt S.M. et al., 2013]. Другим механизмом может служить дифференцировка МСК в эндотелиоциты. По поводу данного явления в научной литературе нет единого мнения. С одной стороны *in vitro* показано, что МСК при определенных условиях культивирования начинают экспрессировать маркеры эндотелиоцитов, в том числе CD 31 [Pacini S., Petrini I., 2014]. Однако *in vivo* при моделировании на лабораторных животных ишемических повреждений различных органов обнаружены только единичные МСК дифференцирующиеся в эндотелиоциты [Aguilera V. et al., 2014]. Подобные разночтения, видимо, объясняются гетерогенностью популяции МСК, среди которых присутствуют клетки с разным дифференцировочным потенциалом [Vittorio O. et al., 2013]. Об этом свидетельствуют также работы по выявлению прогениторных клеток эндотелиоцитов капилляров печени. Установлено, что после резекции печени в нее мигрирует значительное число клеток костномозгового происхождения [Ma H.C. et al., 2014]. При этом наблюдается две волны миграции. Первая волна миграции предшествует началу активной пролиферации гепатоцитов. Вероятно, большая доля клеток, мигрирующих в первой волне, являются МСК, которые посредством паракринного эффекта стимулируют размножение гепатоцитов. Вторая волна миграции приводит к появлению в печени большого числа эндотелиоцитов костномозгового происхождения. Показано, что прогениторные клетки эндотелиоцитов синусоидных капилляров печени располагаются в красном

костном мозге, однако эти клетки отличаются от типичных МСК по набору экспрессируемых ими маркеров [De Leve L.D., 2013].

Помимо МСК, экспрессирующих CD31, через 7 суток после введения обнаружены единичные трансплантированные PKN26+клетки, несущие маркер так называемых активных фибробластов FAP α . Ранее FAP α рассматривался как один из возможных маркеров фибробластов [Kelly T. et al., 2012]. Однако имеются данные, ставящие под сомнение специфичность данного маркера: показано, что FAP α экспрессируется в нормальных условиях на поверхности МСК [Bae S. et al., 2008]. Идентификация фибробластов с помощью иммуногистохимических методов является трудно разрешимой проблемой в связи с гетерогенностью популяции данного вида клеток [Darby I.A. et al., 2014].

Таким образом, при введении МСК пупочного канатика в селезенку после субтотальной резекции печени выявлено, что трансплантированные клетки мигрируют в печень, но не дифференцируются в гепатоциты, холангиоциты, гладкие миоциты или миофибробласты. При этом единичные клетки, видимо, дифференцировались в эндотелиоциты. Полученные данные свидетельствуют о том, что заместительный механизм стимуляции регенерации не является ведущим для МСК пупочного канатика в случае восстановления массы печени крыс после субтотальной резекции.

Какова же дальнейшая судьба трансплантированных МСК. При иммуногистохимическом исследовании часть меченых клеток в селезенке и печени реагировала с антителами к маркеру макрофагов CD68, что свидетельствует о фагоцитозе макрофагами меченых МСК или фрагментов их мембран. В течение 3 суток после субтотальной резекции печени и трансплантации МСК почти 100% введенных клеток элиминировалось макрофагами.

Как следует из полученных результатов, элиминация аллогенных МСК происходит с большей интенсивностью в селезенке – органе с высоким

содержанием активно фагоцитирующих макрофагов. Скорость элиминации трансплантированных клеток в селезенке может быть очень важна для исследований, в которых данный способ введения рассматривают как достаточно эффективный для доставки клеток в поврежденную печень (вследствие общности кровотока этих органов) [Li J. et al., 2011, Sun S. et al., 2013]. Несмотря на элиминацию трансплантированных аллогенных МСК, они все же оказывают положительный эффект на течение репаративных процессов.

В связи с быстрой элиминацией трансплантированных МСК возникает вопрос о механизмах терапевтического действия аллогенных клеток. По-видимому, стимуляция регенерации происходит за счет паракринных факторов регуляции [Wu X.-B., R. Тао, 2012]. Данный механизм может реализовываться несколькими путями.

При условии существования резидентных прогениторных клеток печени на их жизнедеятельность может влиять весь спектр факторов роста и цитокинов, выделяемых МСК. Трансплантированные клетки могут стимулировать их мобилизацию, обеспечивать хоминг в область повреждения, повышение пролиферативной активности и дифференцировку в различных направлениях. Для некоторых органов подобный механизм терапевтической активности МСК рассматривается как ведущий [Leri A. et al., 2005], для регенерации печени имеются лишь косвенные указания на способность МСК стимулировать резидентные прогениторные клетки [Bird T.G. et al., 2013].

Некоторыми авторами в качестве прогениторной клетки печени рассматриваются овальные клетки, локализующиеся в стенке терминальных холангиол [Michalopoulos G.K., 2011]. Происхождение данных клеток остается не до конца изученным. В настоящее время большинство исследователей указывают на родство овальных клеток и билиарного эпителия [Jakubowski A. et al., 2005]. Однако имеются данные, что в их

биогенезе участвуют и неизвестные прогениторные клетки красного мозга [Facciorusso A., 2014]. В других работах показано, что гемопоэтические клетки костного мозга могут быть родоначальниками звездчатых клеток печени [Wells R.G., Schwabe R.F., 2015].

Изучено влияние трансплантации МСК пупочного канатика на активность прогениторных клеток печени и других альтернативных путей репарации на модели регенерации печени крыс после субтотальной резекции. Динамика CK19+ и SOX9+ клеток в печени после субтотальной резекции не отличается от динамики данных маркеров у животных, которым вместо суспензии МСК вводили 0,9% раствора NaCl. При этом какие-либо клетки с промежуточным между гепатоцитами и холангиоцитами фенотипом отсутствовали. Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что МСК пупочного канатика не вызывают активацию резидентных прогениторных клеток печени в условиях регенерации после субтотальной резекции печени крыс.

Одним из возможных механизмов стимуляции репаративных процессов может быть воздействие МСК на энергетический обмен клеток. Так интрамиокардиальная трансплантация МСК улучшает потребление глюкозы и показатели окислительного фосфорилирования поврежденного миокарда, при этом в сердце отмечается увеличение экспрессии транскрипционного фактора PGC-1 α , который стимулирует биогенез новых митохондрий, а также дыхание и окислительное фосфорилирование в них [Hughey C.C. et al., 2013]. Другим возможным механизмом благоприятного влияния МСК на энергетический обмен в поврежденных органах в настоящее время рассматривают трансфер митохондрий из трансплантированных клеток в клетки реципиента [Prockop D.J., Oh J.Y., 2012]. Перемещение митохондрий из МСК в другие клетки происходит через прямые межклеточные контакты, так называемые туннельные нанотрубки [Vallabhaneni K.C. et al., 2012].

Трансплантация МСК пупочного канатика в условиях регенерации печени крыс после субтотальной резекции оказывает заметное воздействие на энергетический обмен гепатоцитов. Это проявлялось в большем содержании митохондриального белка, ускорении восстановления в ткани печени уровня цитохромов b и c, цитохрома aa3.

Данные о скорости митохондриального дыхания согласуются с полученными значениями содержания цитохромов в митохондриях. Цитохромы b и aa3 входят в состав третьего и четвертого комплексов дыхательной цепи митохондрий. Цитохром c осуществляет перенос электрона с третьего на четвертый комплекс дыхательной цепи. Таким образом, одновременное увеличение количества цитохромов без изменения их соотношения, является свидетельством увеличения количества дыхательных цепей в митохондриях ткани печени в процессе регенерации. Это объясняет увеличение скорости дыхания в группе сравнения. В группе животных с трансплантацией МСК скорость дыхания, по-видимому, лимитируется на уровне дыхательного комплекса 4, в состав которого входит цитохром aa3.

Ранее было показано, что более высокая скорость митохондриального дыхания, вызванная индукцией экспрессии белка Lin28a, коррелирует с более высокой скоростью регенерации ткани [Shyh-Chang N. et al., 2013]. На первый взгляд, наблюдается обратная тенденция. В группе без введения МСК, для которой было зарегистрировано увеличение скорости митохондриального дыхания, содержание митохондрий и цитохромов в ткани печени восстанавливалось медленнее, чем у животных с введением МСК, для которой не наблюдалось увеличения скорости дыхания. Печень животных группы сравнения еще находилась на стадии активной пролиферации, роста и дифференцировки ткани, для которой необходимым является активное митохондриальное дыхание в bc1 комплексе [Zhang Y. et al., 2013] и повышенная продукция активных форм кислорода [Zhang Y. et al.,

2013], индуцирующая аутофагию на ранних стадиях регенерации [Toshima T. et al., 2014]. Печень животных, которым трансплантировали МСК, по-видимому, уже прошла этап активного восстановления массы печени и перешла на стадию нормализации митохондриальной функции, при этом значение скорости сопряженного дыхания падало к 7 суткам до нормальных величин.

Большое значение в терапевтической активности МСК имеет их воздействие на воспаление, реализуемое за счет тех же паракринных факторов, в частности, повышения продукции IL-4, IL-13, TSG-6 и снижения TNF α , IL-6 [Sato Y. et al., 2005]. Уменьшение воспалительной реакции может быть реализовано за счет влияния паракринных факторов на клетки иммунной системы, в особенности на макрофаги [Burchfield J.S., Dimmeler S., 2008, Tögel F., Westenfelder C., 2011]. После трансплантации МСК происходит увеличение доли активированных макрофагов альтернативного фенотипа M2 (противовоспалительных) и уменьшение провоспалительных макрофагов M1 [Фатхудинов Т.Х. и соавт., 2013, Prockop D.J., 2013].

При трансплантации МСК пупочного канатика крысам после субтотальной резекции обнаружено статистически значимое по сравнению с животными, которым не вводили клетки, снижение общего количества макрофагов в печени, экспрессирующих CD68. На том же сроке в печени крыс, которым вводили МСК достоверно по сравнению с соответствующим контролем повышалось количество так называемых M2 макрофагов, которые экспрессировали CD206.

Основным медиатором M2 пути активации макрофагов считается PGE2, синтезируемый МСК. Тем более парадоксальным выглядит наблюдение, что системное введение PGE2 оказывает провоспалительное действие [Madrigal M., 2014], что еще раз подтверждает, что биологическая активность МСК обусловлена более сложными механизмами. Влияние МСК на течение воспалительного процесса и поляризацию активированных

макрофагов является вариантом паракринного механизма терапевтической активности МСК. Следует понимать, что изменение баланса может происходить как за счет подавления M1-пути активации, так и за счет стимуляции M2-пути активации, при этом часть макрофагов может оставаться в неактивированном состоянии [Nakajima H. et al, 2012]. Таким образом, смещение оси M1/M2 *in vivo* может быть обеспечено за счет блокирования IL-6, активирующего M1 макрофаги [Nakajima H. et al, 2012], введения IL-4 [Kiguchi N. et al., 2015] или IL-10, активирующих M2a и M2C типы соответственно [Wu J. et al., 2010]. Помимо влияния на воспаление паракринный механизм терапевтической активности МСК может проявляться в способности стимулировать синтез HGF и других факторов роста в печени [Liu T. et al., 2016].

Несмотря на литературные данные, в соответствии с которыми МСК могут изменять экспрессию генов цитокинов, после субтотальной резекции изменение экспрессии генов цитокинов, так же как и генов факторов роста при трансплантации МСК пупочного канатика по сравнению с животными, которым не вводили клетки, не было выявлено. Исходя из полученных данных, остается неясным за счет, каких молекулярных механизмов МСК оказывали влияние на пролиферацию гепатоцитов, а также на соотношение функциональных типов макрофагов в регенерирующей печени.

Стоит заметить, что МСК обладают способностью синтезировать богатый набор биологически активных молекул [Арутюнян И.В. и соавт., 2015], при этом эффект оказываемый МСК является дозозависимым и очень часто кратковременным, что затрудняет изучение паракринного эффекта *in vivo*. Кроме того, в тех работах, где был показан положительный эффект от введения МСК при регенерации печени отмечается, что более выраженный эффект наблюдался при повторном введении МСК, а также в том случае, когда трансплантация клеток предшествовала нанесению повреждения [Людуп А.В. и соавт., 2010, Онищенко Н.А. и соавт., 2011].

С другой стороны, молекулярные механизмы, регулирующие пролиферацию гепатоцитов, поляризацию макрофагов изучены не до конца, особенно в условиях экстремальных травм печени. Возможно, у МСК будут открыты новые активные вещества, помимо известных цитокинов и факторов роста, которые способны влиять на ход репаративного процесса в печени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Субтотальная резекция (удаление 80% массы) является тяжелой травмой для печени. Однако выполнение такой резекции не препятствует регенерации, которая осуществляется за счет пролиферации гепатоцитов. Участие прогениторных клеток печени и трансдифференцировки гепатоцитов в холангиоциты не было выявлено, что также подтверждается снижением активности генов NOTCH-сигнального пути. Несмотря на это, субтотальная резекция вызывала выраженное изменение состояния органа, как на молекулярном, так и на клеточном уровне. Наиболее заметные изменения были отмечены в экспрессии генов-регуляторов регенерации печени, пролиферации гепатоцитов и популяции макрофагов.

Субтотальная резекция вызывала изменение экспрессии генов основных регуляторов регенерации не только в самой печени, а также в легких и почках. В печени отмечалось два периода повышенной активности исследуемых генов – в начальном периоде регенерации (3-72ч после резекции) и позднем (7-10 сутки). Активация экспрессии генов в легких и почках после субтотальной резекции печени свидетельствовала о напряжении репаративных потенция самой печени и, видимо, происходило вследствие удаления большого количества факторов, депонируемых в печени и регулирующих ее регенерацию, в первую очередь, таких как HGF. Низкий уровень HGF в организме оперированных крыс на ранних этапах после субтотальной резекции, приводил к временному блоку митотического цикла гепатоцитов, который является фактором, нарушающим регенерацию печени после субтотальной резекции. Другой особенностью пролиферации гепатоцитов было наличие двух пиков митотического индекса: раннего – через 48-72ч и позднего – через 7 суток после резекции. Для поддержания длительной и масштабной пролиферации в гепатоцитах экспрессировался маркер малодифференцированных клеток SOX9. Апоптоз гепатоцитов по

данным метода TUNEL и исследования экспрессии каспазы 3 не был выражен после субтотальной резекции печени.

После 80% резекции в печени крыс увеличивалось общее число макрофагов, которое происходило преимущественно за счет их пролиферации, а не миграции. Подавляющее число макрофагов печени в период регенерации после 80% резекции имели фенотип прорегенераторных M2 макрофагов.

Трансплантация МСК пупочного канатика увеличивала выживаемость подопытных крыс, стимулирует пролиферацию гепатоцитов, повышает долю M2 макрофагов, а также стимулировала восстановление функций митохондриального аппарата. При этом введенные клетки быстро элиминировались органными макрофагами и не дифференцировались в какой-либо из типов клеток печени.



Рис. 54. Схема регуляции регенерации печени крыс после субтотальной резекции

ВЫВОДЫ

1. На модели субтотальной резекции печени крыс раскрыты молекулярные и клеточные механизмы органотипической регенерации, характеризующиеся двухфазной динамикой митотической активности гепатоцитов и экспрессии генов, регулирующих регенераторные процессы.
2. Нарушение регенераторных процессов в раннем периоде после субтотальной резекции печени обусловлено временным блоком митотического цикла гепатоцитов при выходе из G_0 -периода, что подтверждается отсутствием, экспрессии Ki67 и митотических делений гепатоцитов в течение 30 часов после резекции.
3. Временной блок митотической активности гепатоцитов связан с низким содержанием в печени оперированных животных индукторов пролиферации гепатоцитов - фактора некроза опухолей α TNF α и фактора роста гепатоцитов HGF. Блок митотического цикла после субтотальной резекции по данным TUNEL-теста и экспрессии каспазы 3 не сопровождается увеличением уровня апоптоза гепатоцитов.
4. После субтотальной резекции печени отмечается два пика митотической активности гепатоцитов: ранний — через 2 и поздний — через 7 суток. С пиками митоза гепатоцитов совпадают два периода повышенного синтеза в печени фактора транскрипции SOX9, поддерживающего клетки в малодифференцированном состоянии.
5. В печени после субтотальной резекции обнаружены две фазы повышения экспрессии генов регуляторных молекул: в ранней фазе (через 3-48 часов) повышается экспрессия генов *il6*, *il10*, *inos*, *mmp9*, *fgf2*, *tgfb*, *fn14*, *sox9*) и в поздней (7-е сутки) - генов *illb*, *tnfa*, *tweak*, *inos*, *hgf*, что соответствует динамике митотической активности гепатоцитов.
6. Субтотальная резекция печени в период с 6 ч до 30 ч после операции вызывает компенсаторное повышение экспрессии генов цитокинов и

факторов роста в легких - генов *il6*, *tnfa*, *hgf*, *fgf2*, в почках - генов *il6*, *il10*, *hgf*, стимулирующих пролиферацию гепатоцитов.

7. В процессе регенерации печени после субтотальной резекции доля клеток, экспрессирующих цитокератин 19, не изменяется, при этом происходит подавление экспрессии генов *notch1* и *notch2* NOTCH-сигнального пути, что свидетельствует об отсутствии активации прогениторных клеток.

8. Субтотальная резекция вызывает активацию популяции резидентных макрофагов печени, что проявляется в увеличении общего числа макрофагов, усилении экспрессии генов провоспалительных цитокинов *tnfa*, *il1b*, *il6* и противовоспалительного цитокина *il10*.

9. Мультипотентные стромальные клетки пупочного канатика, трансплантированные в селезенку, мигрируют в печень и подвергаются полной элиминации в течение 3 суток. Введение мультипотентных стромальных клеток стимулирует репаративный процесс в печени, повышая уровень пролиферации гепатоцитов и увеличивая долю M2 прорегенераторных макрофагов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

МСК – мультипотентные стромальные клетки

МИ-митотический индекс

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени

IL-1b – интерлейкин 1b

IL-6 – интерлейкин 6

IL-10 – интерлейкин 10

HGF – фактор роста гепатоцитов

EGF - эпидермальный фактор роста

FGF2 - фактор роста фибробластов 2

TGFb - трансформирующий фактор роста b

VEGF – сосудистый фактор роста эндотелия

TNFa - фактор некроза опухолей a

iNOs – индуцированная NO синтетаза

MMP9 – матриксная металлопротеиназа 9

СК19 – цитокератин 19

panCK - панцитокератин

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арутюнян И.В. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки пупочного канатика: биологические свойства и клиническое применение. / Арутюнян И.В., Макаров А.В., Ельчанинов А.В. [и др.] // Гены и Клетки – 2015. – №2 (10). – С. 30-38
2. Бабаева А.Г. Регенерация: факты и перспектива / Бабаева А.Г – М.: Издательство РАМН, 2009. – 336 с.
3. Бродский В.Я. Клеточная полиплоидия. Пролиферация и полиплоидия /Бродский В.Я., Урываева И.В. – М.: Наука, 1981. – 259 с.
4. Делоне Г.В. Анализ постнатального роста печени мыши на основе учета числа гепатоцитов, их массы и плоидности / Делоне Г.В., Урываева И.В., Корецкий В.Ф// Онтогенез. – 1987. – №3(18). – С. 304-307
5. Ельчанинов А.В. Регенерация печени млекопитающих / Ельчанинов А.В. Фатхудинов Т.Х., Макаров А.В.// Клиническая и экспериментальная морфология. –2012. –№ 4. –С.57-61
6. Ельчанинов А.В. Динамика пролиферации гепатоцитов регенерирующей печени плода крысы /Ельчанинов А.В., Большакова Г.Б. // Бюлл. экспер. биол. и мед. –2011. –№3 –С. 352–355.
7. Ельчанинов А.В. Пролиферация и клеточная гибель гепатоцитов регенерирующей печени плодов крыс /Ельчанинов А.В., Большакова Г.Б.// Цитология. – 2012. – № 4(54). – С. 313–317
8. Ельчанинов А.В. Репаративная регенерация печени плодов крыс после частичной гепатэктомии /Ельчанинов А.В., Большакова Г.Б. // Бюлл. экспер. биол. и мед. – 2010. –№9. – С. 352–355.
9. Люндуп А.В. Стволовые/прогениторные клетки печени и костного мозга как регуляторы восстановительной регенерации поврежденной печени. /Люндуп А.В., Онищенко Н.А., Шагидулин М.Ю. [и др.]// Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2010. – №2. – С. 100-107.

10. Онищенко Н.А. Двухфазная динамика воздействия мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток (ММСК) костного мозга на печень при моделировании фиброзирующего гепатита. / Онищенко Н.А., Люндуп А.В., Газизов И.М. [и др.]// Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2011. №2 (13). – С. 51-58.
11. Полежаев Л.В. Регенерация путём индукции. / Полежаев Л.В. – М: Медицина, 1977. – 179 с.
12. Романова Л.К. Регуляция восстановительных процессов / Романова Л.К. – М.: Издательство МГУ, 1984. – 175с.
13. Рябинина З.А. Полиплоидия и гипертрофия клеток в процессах роста и восстановления /Рябинина З.А., Бенюш В.А. – М.: Медицина, 1973. – 207 с.
14. Сакута Г.А. Особенности регенерации печени китайского хомячка *Cricetus griseus* / Сакута Г.А., Байдюк Е.В., Жумагалиева А. А. // Цитология. – 2011. – №53 (11). – С.868–873.
15. Сидорова В.Ф. Возраст и восстановительная способность органов у млекопитающих / Сидорова В.Ф. – М.: Медицина. 1976. – 199 с.
16. Сидорова В.Ф. Постнатальный рост и восстановление внутренних органов у позвоночных / Сидорова В.Ф. – М.: Наука, 1969. – 189с.
17. Сидорова В.Ф. Регенерация печени у млекопитающих / Сидорова В.Ф., Рябинина З.А., Лейкина Е.М. – М.: Медицина. 1966. – 205 с.
18. Фатхудинов Т.Х. Механизмы терапевтической активности мультипотентных клеток при заболеваниях сердца. / Фатхудинов Т.Х., Большакова Г.Б., Гольдштейн Д.В. [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2013. – № 4. – С.183-192
19. Чикунова М.В. Лечение печеночной недостаточности (обзор литературы) / М. В. Чикунова, Т. В. Лисовская, И. Б. Хлынов // Уральский медицинский журнал. – 2007. – № 5 (33). – С. 3–6.
20. Шалахметова Т.М. Содержание гликогена в синтезирующих и не синтезирующих ДНК гепатоцитах крыс разного возраста / Шалахметова

Т.М., Кудрявцева М.В., Завадская Е.Э.// Цитология. – 1981. – №23 (5). – С. 539-544.

21. Aguilera V. Endothelium transdifferentiated from Wharton's jelly mesenchymal cells promote tissue regeneration: potential role of soluble pro-angiogenic factors. / Aguilera V., Briceño L., Contreras H. [et al.] // PLoS One. – 2014. – 9(11):e111025. doi: 10.1371/journal.pone.0111025.

22. Allen K.J. Liver cell transplantation: the road to clinical application. / Allen K.J., Soriano H.E.// J.Lab. Clin. Med. – 2001. – N138. – P. 298–312.

23. am Esch J.S. Portal application of autologous CD133b bone marrow cells to the liver: a novel concept to support hepatic regeneration. / am Esch J.S., Knoefel W.T., Klein M., [et al.] // Stem Cells. – 2005. – N 23. – P. 463-470.

24. Anatskaya O.V. Genome multiplication as adaptation to tissue survival: Evidence from gene expression in mammalian heart and liver / Anatskaya O.V., Vinogradov A.E. // Genomics. – 2007. – N89. – P. 70–80.

25. Anderson S.C. p53 gene therapy in a rat model of hepatocellular carcinoma: intra-arterial delivery of a recombinant adenovirus / Anderson S.C., Johnson D.E., Harris M.P. [et al.] // Clin. Cancer Res. – 1998. – N4(7). – P.1649-59.

26. Antoniou A. Intrahepatic bile ducts develop according to a new mode of tubulogenesis regulated by the transcription factor SOX9. / Antoniou A., Raynaud P., Cordi S. [et al.] // Gastroenterology. –2009. – N 136(7). – P.2325-33.

27. Antunes M.A. Mesenchymal stem cell trials for pulmonary diseases. / Antunes M.A., Laffey J.G., Pelosi .P, [et al.]// J. Cell. Biochem. – 2014. – Vol.115(6). – P.1023-32. doi: 10.1002/jcb.24783

28. Arnold L. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into anti-inflammatory macrophages to support myogenesis. / Arnold L., Henry, A., Poron, F. [et al.]// J. Exp. Med. – 2007. – N 204. – P.1071-1081.

29. Arutyunyan I. Elimination of allogeneic multipotent stromal cells by host macrophages in different models of regeneration. / Arutyunyan I., Elchaninov A.,

- Fatkhudinov T. [et al.] // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* – 2015. – Vol. 8(5). – P. 4469-80.
30. Atta H.M. Gene therapy for liver regeneration: Experimental studies and prospects for clinical trials. / Atta H.M.//*World J. Gastroenterol.* – 2010. – Vol. 16(32). – P. 4019-4030
31. Azad N. Role of oxidative/nitrosative stress-mediated Bcl-2 regulation in apoptosis and malignant transformation. / Azad N., Iyer A., Vallyathan V. [et al.]// *Ann. N.-Y. Acad. Sci.* – 2010. – Vol.1203. – P.1–6.
32. Bae S. Fibroblast activation protein alpha identifies mesenchymal stromal cells from human bone marrow. / Bae S., Park C.W., Son H.K. [et al.]// *Br. J. Haematol.* – 2008. – Vol.142(5). P.827-30.
33. Baertschiger R.M. Potential of human multipotent mesenchymal stromal cells in injured liver / Baertschiger R.M., Serre-Beinier V., Morel P. [et al.]// *PLoS ONE* – 4(8). – 2009: e6657. doi:10.1371/journal.pone.0006657
34. Bain C.C. Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors. / Bain C.C., Scott C.L., Uronen-Hansson H. [et al.]// *Mucosal Immunol.* – 2013. – Vol. 6(3). – P.498-510.
35. Barbason H. Synchronizing effect of corticosterone's circadian rhythm on the DNA synthesis rate in the liver of the young rat. / Barbason H., Fourré F., Focan C.//*Pathol. Biol. (Paris)*. – 2003. – Vol.51, №4. – P. 210–211.
36. Barbay V. Role of M2-like macrophage recruitment during angiogenic growth factor therapy. / Barbay V., Houssari M., Mekki M. [et al.]// *Angiogenesis*. 2015– Vol.18(2). – P.191-200.
37. Beljaars L. Hepatic localization of macrophage phenotypes during fibrogenesis and resolution of fibrosis in mice and humans / Beljaars L., Schippers M., Reker-Smit C. [et al.] // *Front Immunol.* – 2014. Vol. 5:430. doi: 10.3389/fimmu.2014.00430. eCollection 2014.

38. Bellodi-Privato M. Successful gene therapy of the Gunn rat by in vivo neonatal hepatic gene transfer using murine oncoretroviral vectors./ Bellodi-Privato M., Aubert D., Pichard V. [et al.]// *Hepatology*. – 2005. – N 42. – P. 431-438
39. Best J. Role of liver progenitors in liver regeneration. / Best J., Manka P., Syn W.K. [et al.]// *Hepatobiliary Surg. Nutr.* – 2015. – Vol. 4(1). P.48-58.
40. Bilzer M. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. / Bilzer M., Roggel F., Gerbes A.L. // *Liver Int.* – 2006. – Vol. 26(10). – 1175-86.
41. Bird T.G. Bone marrow injection stimulates hepatic ductular reactions in the absence of injury via macrophage-mediated TWEAK signaling. / Bird T.G., Lu W.Y., Boulter L. [et al.]// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2013. – Vol. 110(16). – P. 6542-6547.
42. Boulter L. Macrophage derived Wnt signalling opposes Notch signalling in a Numb mediated manner to specify HPC fate in chronic liver disease in human and mouse. / Boulter L., Govaere O., Bird T.G. [et al.]// *Nat Med.* – 2012. – Vol. 18(4). – P. 572–579.
43. Boulter L. Differentiation of progenitors in the liver: a matter of local choice. / Boulter L., Lu W.Y., Forbes S.J.// *J. Clin. Invest.* –2013. –Vol. 123.– P.1867-1873.
44. Bras M., Queenan B., Susiin S.A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. / Bras M., Queenan B., Susiin S.A.// *Biochemistry (Mosc.)*. –2005. –Vol.70, №2. – P. 231–239.
45. Brunetti-Pierri N. Gene therapy for inborn errors of liver metabolism: progress towards clinical applications / Brunetti-Pierri N.//*Italian Journal of Pediatrics* –2008.– Vol34(2) doi:10.1186/1824-7288-34-2
46. Bucher N.R. The effect of age on regeneration of rat liver./ Bucher N.R., Glinos A.D.// *Cancer Research* 1950. – Vol.10, №5. – P. 324–332.
47. Bucher N.R.The rate of incorporation of labeled thymidine into the deoxyribonucleic acid of regenerating rat liver in relation to the amount of liver

- excised. / Bucher N.R., Swaffield M.N. // Cancer Research. – 1964. – Vol.24. – P. 1611–1625
48. Bucher N.R. The influence of age upon the incorporation of thymidine-2-C¹⁴ into the DNA of regenerating rat liver. / Bucher N.R., Swaffield M.N., DiTroia A.F. // Cancer Research. – 1964. – Vol.24. – P. 509–512.
49. Burchfield J.S. Role of paracrine factors in stem and progenitor cell mediated cardiac repair and tissue fibrosis. / Burchfield J.S., Dimmeler S. // Fibrogenesis Tissue Repair. – 2008. – Vol. 1, N 1. – P. 1–4
50. Carpentier B. Artificial and bioartificial liver devices: present and future. / Carpentier B., Gautier A., Legallais C. // Gut. – 2009. – Vol. 58. – P.1690–1702.
51. Celton-Morizur S. Polyploidization of liver cells. / Celton-Morizur S., Desdouets C. // Adv. Exp. Med Biol. – 2010. – Vol. 676. – P. 123–135.
52. Chazaud B. Macrophages: supportive cells for tissue repair and regeneration. / Chazaud B. // Immunobiology. – 2014. – Vol. 219(3). – P.172-8.
53. Chen F.-M. Homing of endogenous stem/progenitor cells for in situ tissue regeneration: Promises, strategies, and translational perspectives. / Chen F.-M., Wu L.A., Zhang M. [et al.] // Biomaterials. – 2011. – Vol. 32, N12. – P3189-3209
54. Chen M.Y. Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. / Chen M.Y., Lie P.C., Li Z.L. [et al.] // Exp Hematol. – 2009. – Vol. 37(5). – P.629–40.
55. Chen S. p53-insensitive PUMA down-regulation is essential in the early phase of liver regeneration after partial hepatectomy in mice. / Chen S., Zheng J., Hao Q. [et al.] // J. Hepatol. – 2010. – Vol.52, №6. – P.864–871.
56. Chen Y. MicroRNAs: the fine modulators of liver development and function. / Chen Y., Verfaillie CM. // Liver Int. – 2014. – Vol. 34(7). –P. 976-990.
57. Chistiakov D.A. Liver Regenerative Medicine: Advances and Challenges / Chistiakov D.A. // Cells Tissues Organs – 2012. – Vol.196. – P. 291–312

58. Conrad R. A comparison between low intensity and reduced intensity conditioning in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for solid tumors. / Conrad R., Remberger M., Cederlund K. [et al.]// *Haematologica*. – 2008. – Vol. 93. P.265-272.
59. Coudriet G.M. Hepatocyte growth factor modulates interleukin-6 production in bone marrow derived macrophages: implications for inflammatory mediated diseases. / Coudriet G.M., He J., Trucco M. [et al.] // *PLoS ONE*. – 2010. – Vol.5(11): e15384.
60. Croquelois A. Inducible inactivation of Notch1 causes nodular regenerative hyperplasia in mice./ Croquelois A., Blindenbacher A., Terracciano L., Wang X. et al.// *Hepatology*. – 2005. – Vol. 41(3). – P.487-96.
61. Dahm F., Georgiev P., Clavien P.A. Small-for-size syndrome after partial liver transplantation: definition, mechanisms of disease and clinical implications. / Dahm F., Georgiev P., Clavien P.A. // *Am. J. Transplant.* – 2005. – Vol. 5(11). – P. 2605-10.
62. Dalgetty D.M. Progress and future challenges in stem cell-derived liver technologies / Dalgetty D.M., Medine C.N., Iredale J. [et al.]// *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2009. – Vol. 297. – P. 241–248.
63. Darby I.A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. / Darby I.A., Laverdet B., Bonté F. [et al.] // *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* – 2014. – Vol.7. –P.301-11.
64. David B. Mass transfers in a fluidized bed bioreactor using alginate beads for a future bioartificial liver. / David B., E. Dore M.Y. Legallais J.C. // *Int. J. Artif. Organs.* – 2004. – Vol. 27. – P. 284– 293.
65. Davies L.C. Tissue-resident macrophages. / Davies L.C., Jenkins S.J., Allen J.E. [et al.] // *Nat Immunol.* – 2013. – Vol. 14(10). – P.986-95.
66. Davies L.C. Tissue-resident macrophages: then and now. / Davies L.C., Taylor P.R.// *Immunology*. – 2015. – Vol. 144(4). – P.541-8.

67. DeLeve L.D. Liver sinusoidal endothelial cells and liver regeneration. / DeLeve L.D.// J. Clin. Invest. – 2013. – Vol. 123(5). – P.1861-6.
68. Demetriou A.A. Replacement of liver function in rats by transplantation of microcarrier-attached hepatocytes. / Demetriou A.A., Whiting J.F., Feldman D. [et al.]// Science – 1986. – Vol.233. – P. 1190–1192.
69. Devey L. Tissue-resident macrophages protect the liver from ischemia reperfusion injury via a heme oxygenase-1-dependent mechanism. / Devey L., Ferenbach D., Mohr E. [et al.] // Mol Ther. – 2009. – 17(1). – P.65-72.
70. Dhawan A. Human hepatocyte transplantation: current experience and future challenges. /Dhawan A., Puppi J., Hughes R.D. [et al.]// Nat. Rev. Gastroenterol Hepatol. – 2010. – Vol. 7. – P. 288-298.
71. di Bonzo L.V. Human mesenchymal stem cells as a two-edged sword in hepatic regenerative medicine: engraftment and hepatocyte differentiation versus profibrogenic potential. / di Bonzo L.V., Ferrero I., Cravanzola C. [et al.] // Gut. – 2008. – Vol. 57(2). – P.223-31.
72. Diekmann S. Present and future developments in hepatic tissue engineering for liver support systems: state of the art and future developments of hepatic cell culture techniques for the use in liver support systems. / Diekmann S., Bader A., Schmitmeier S. // Cytotechnology 2006. – Vol. 50. – P.163-179.
73. Dominici M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. / Dominici M., Le Blanc K., Mueller I. [et al.] //The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. – 2006. – Vol. 8(4). – P. 315-7.
74. Drosos I. Stem cells in liver regeneration and their potential clinical applications. / Drosos I., Kolios G. // Stem Cell Rev. and Rep. – 2013. – Vol. 9(5). – P.668-84.
75. Duffield J.S. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. / Duffield J.S., Forbes S.J., Constandinou C.M. [et al.]// J. Clin. Invest. – 2005. – Vol.115(1). –P.56-65.

76. Eguchi S. Treatment of hypercholesterolemia in the Watanabe rabbit using allogeneic hepatocellular transplantation under a regeneration stimulus. / Eguchi S., Rozga J., Lebow L.T. [et al.]//Transplantation. – 1996. – Vol. 62. – P. 588–593
77. Ellis A.J. Pilot-controlled trial of the extracorporeal liver assist device in acute liver failure. / Ellis A.J., Hughes R.D., Wendon J.A. [et al.] // Hepatology. – 1996. –Vol. 24. – 1446–1451.
78. Enosawa S. In vivo estimation of bioartificial liver with recombinant HepG2 cells using pigs with ischemic liver failure. / Enosawa S., Miyashita T., Fujita Y. [et al.] //Cell Transplant. – 2001. – Vol.10. – P. 429-433.
79. Epelman S. Origin and functions of tissue macrophages. / Epelman S., Lavine K.J., Randolph G.J.// Immunity. – 2014. – Vol.41(1). – P.21-35.
80. Erro E. Bioengineering the Liver: Scale-up and cool chain delivery of the liver cell biomass for clinical targeting in a bioartificial liver support system. / Erro E., Bundy J., Massie I. [et al.] // BioResearch Open Access. – 2013. – Volume 2, Number 1.
81. Eshkenazy R. Small for size liver remnant following resection: prevention and management. / Eshkenazy R., Dreznik Y., Lahat E. [et al.]// Hepatobiliary Surg Nutr. –2014. – Vol.3. – P. 303–312.
82. Estabrook R. Methods in enzymology. / Estabrook R. – Vol. 10. – P.41-7, 1967.
83. Facciorusso A. Are hematopoietic stem cells involved in hepatocarcinogenesis? / Facciorusso A., Antonino M., Del Prete V. [et al.] // Hepatobiliary Surg Nutr. – 2014. – Vol. 3(4). – P.99-206.
84. Farber E. Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylamino-fluorene, and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. / Farber E. // Cancer Res. – 1956. – Vol. 16(2). – P. 142–148.

85. Fausto N. Knocking out genes to study liver regeneration: present and future. / Fausto N. // *Am. J Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 1999. – Vol. 277. – P. 917–921.
86. Fausto N. Liver Regeneration. / Fausto N., Campbell J.S., Riehle K.J. // *Hepatology.* – 2006 – Vol.43(2 Suppl 1). –P.45-53.
87. Fei Y. Adenovirus-mediated combined anti-angiogenic and pro-apoptotic gene therapy enhances antitumor efficacy in hepatocellular carcinoma. / Fei Y., Zheng Y., Laiqiang H. // *Oncology Letters.* – 2013. – Vol.5. – P.348-354.
88. Fisher R.A. Human hepatocyte transplantation: worldwide results. / Fisher R.A., Strom S.C. // *Transplantation.* – 2006. – Vol.82. – P. 441–449.
89. Fontana-Ayoub M. Selected media and chemicals for respirometry with mitochondrial preparations. / Fontana-Ayoub M., Fasching M., Gnaiger E. // *Mitochondr Physiol Network.* – 2014. – Vol. 03.02, N17. – P. 1-9.
90. Forbes S.J. New horizons for stem cell therapy in liver disease. / Forbes S.J., Newsome P.N.// *Journal of Hepatology.* – 2012. – Vol. 56. – P. 496–499
91. Friedman S.L. Hepatic fibrosis – overview. / Friedman S.L. // *Toxicology.* – 2008. – Vol. 254(3). – P. 120-9
92. Friedman S.L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. / Friedman S.L. // *Gastroenterology.* – 2008. – Vol.134. – P. 1655–1669.
93. Furuyama K. Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. / Furuyama K., Kawaguchi Y., Akiyama H. [et al.] // *Nat Genet.* – 2011. –Vol.43 (1). – P.34-41.
94. Geissmann F., Jung, S., Littman, D.R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. / Geissmann F., Jung, S., Littman, D.R. // *Immunity.* – 2003. – Vol.19. – P. 71-82.
95. Gentric G. Polyploidy and liver proliferation. / Gentric G., Celton-Morizur S., Desdouets C.// *Clin Res. Hepatol. Gastroenterol.* – 2012. – Vol.36, №1. – P.29-34

96. Gielchinsky Y. Pregnancy restores the regenerative capacity of the aged liver via activation of an mTORC1-controlled hyperplasia/hypertrophy switch. / Gielchinsky Y., Laufer N., Weitman E. [et al.]. // *Genes & Development*. – 2010. – Vol.24. – P. 543–548.
97. Gnaiger E. *Life in the Cold*. / Gnaiger E., Kuznetsov A.V., Schneeberger S. [et al.] Springer, Heidelberg, Berlin, New York, 2000
98. Godlewski G. Liver development in the rat and in man during the embryonic period (Carnegie stages 11—23). / Godlewski G., Gaubert-Cristol R., Rouy S. [et al.]. // *Microscopy research and technique*. – 1997. – N. 39. – P. 314—327.
99. Gorla G.R., Malhi H., Gupta S. Polyploidy associated with oxidative injury attenuates proliferative potential of cells. / Gorla G.R., Malhi H., Gupta S. // *Journal of Cell Science*. – 2001. – Vol.114. – P. 2943–2951.
100. Grompe M. Therapeutic trials in the murine model of hereditary tyrosinaemia type I: a progress report. / Grompe M., Overturf K., al-Dhalimy M. [et al.] // *J. Inherit. Metab. Dis*. – 1998. – Vol.5. – P. 518–531.
101. Grossman M. A pilot study of ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolaemia. / Grossman M., Rader D.J., Muller D.W. [et al.]// *Nature medicine*. –1995. –Vol.5 – P. 1148–1154.
102. Guidotti J.E. Liver cell polyploidization: a pivotal role for binuclear hepatocytes. / Guidotti J.E., Br  gerie O., Robert A. [et al.] // *The journal of biological chemistry*. – 2003. – Vol. 278, №. 21. – P. 19095–19101.
103. Gupta S. Hepatic polyploidy and liver growth control. / Gupta S.// *Seminar in Cancer biology*. – 2000. – Vol. 10. – P.161–171.
104. Habib N.A., Mitry R.R., Sadri R. p53 and gene therapy for hepatocellular carcinoma. / Habib N.A., Mitry R.R., Sadri R. // *Adv. Exp. Med. Biol*. – 1998. – Vol. 451. – P. 499-504.
105. Habibullah C.M. Human fetal hepatocyte transplantation in patients with fulminant hepatic failure. / Habibullah C.M., Syed I.H., Qamar A. [et al.] // *Transplantation*. – 1994. – Vol.58 – P. 951–952

106. Han S. TNF-related weak inducer of apoptosis receptor, a TNF receptor superfamily member, activates NF-kappa B through TNF receptor-associated factors. / Han S., Yoon K., Lee K. [et al.] //Biochem Biophys Res Commun. – 2003. – Vol. 305(4). – P.789-796.
107. Harting M. Immunophenotype characterization of rat mesenchymal stromal cells. / Harting M., Jimenez F., Pati S. [et al.] //Jr. Cytotherapy. – 2008. – Vol.10 (3). – P. 243-5.
108. Hass R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. / Hass R., Kasper C., Böhm S. [et al.] //Cell Commun Signal. – 2011. – Vol.9 (12). doi: 10.1186/1478-811X-9-12.
109. He J., Lu H., Zou Q., Luo L. Regeneration of liver after extreme hepatocyte loss occurs mainly via biliary transdifferentiation in zebrafish. / He J., Lu H., Zou Q. [et al.]// Gastroenterology. – 2014. – Vol. 146(3). – P. 789-800.
110. Higgins G.M. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. / Higgins, G.M., Anderson R.M.// Arch. Pathol. – 1931. – Vol.72. – P. 186-202.
111. Hogeboom G.H. Cytochemical studies of mammalian tissues; isolation of intact mitochondria from rat liver; some biochemical properties of mitochondria and submicroscopic particulate material. / Hogeboom G.H., Schneider W.C., Pallade G.E.// J. Biol. Chem. –1948. –Vol. 172. – P. 619-35.
112. Houck K.A. Acidic fibroblast growth factor (HBGF-1) stimulates DNA synthesis in primary rat hepatocyte cultures./ Houck K.A., Zarnegar R., Muga S.J., [et al.] // J. Cell Physiol. –1990. –Vol.143. –P.129–132.
113. Huang W. Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration / Huang W., Ma K., Zhang J. [et al.]// Science. –2006. – № 312. – P 233-236.
114. Huch M. The plastic cellular states of liver cells: Are EpCAM and Lgr5 fit for purpose? / Huch M., Dollé L.// Hepatology. – 2016. doi: 10.1002/hep.28469.

115. Hughey C.C. Mesenchymal stem cell transplantation for the infarcted heart: therapeutic potential for insulin resistance beyond the heart. / Hughey C.C., Ma L., James F.D. [et al.] // Cardiovascular Diabetology. – 2013. – N. 12. – P.128-142
116. Iakova P. Aging reduces proliferative capacities of liver by switching pathways of C/EBPa growth arrest. / Iakova P., Awad S.S., Timchenko N.A. // Cell. –2003. –Vol.113. – P. 495–506.
117. Ikarashi M. Distinct development and functions of resident and recruited liver Kupffer cells/macrophages./ Ikarashi M., Nakashima H., Kinoshita M. [et al.] // J. Leukoc. Biol. – 2013. – Vol. 94(6). – P. 1325-36.
118. Jakubowski A. TWEAK induces liver progenitor cell proliferation. / Jakubowski A., Ambrose C., Parr M., [et al.] // The Journal of Clinical Investigation. – 2005. – Volume 115 Number 9. – P. 2330- 2340
119. Jeliaskova P. Canonical Notch2 signaling determines biliary cell fates of embryonic hepatoblasts and adult hepatocytes independent of Hes1. / Jeliaskova P., Jörs S., Lee M., Zimmer-Strobl U. et al. // Hepatology. – 2013. – Vol. 57(6). – P. 2469-79.
120. Jetten N. Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo. / Jetten N., Verbruggen S., Gijbels M.J. [et al.]// Angiogenesis. – 2014. – Vol. 17(1). – P.109-18.
121. Johansson A. Non-viral delivery of the porphobilinogen deaminase cDNA into a mouse model of acute intermittent porphyria. / Johansson A., Nowak G., Moller C. [et al.]// Mol. Genet. Metab. – 2004. – Vol.82. – P. 20–26
122. Kageyama R. Roles of Hes genes in neural development. / Kageyama R., Ohtsuka T., Kobayashi T. // Dev. Growth Differ. – 2008. – Vol. 50 Suppl 1. – S97-103.
123. Karaca G. TWEAK/Fn14 signaling is required for liver regeneration after partial hepatectomy in mice. // Karaca G., Swiderska-Syn M., Xie G. [et al.]// PLoS ONE. –2014. – Vol. 9(1). e83987. doi: 10.1371/journal.pone.0083987

124. Karlmark K.R. The fractalkine receptor CX₃CR1 protects against liver fibrosis by controlling differentiation and survival of infiltrating hepatic monocytes. / Karlmark K.R., Zimmermann H.W., Roderburg C. [et al.] // *Hepatology*. – 2010. – Vol. 52(5). – P.1769-82.
125. Karp J.M. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. / Karp J.M., Teo G.S.L. // *Cell Stem Cell*. – 2009. – Vol.3, N4. – P. 206-216
126. Kawaguchi Y.J. Sox9 and programming of liver and pancreatic progenitors. / Kawaguchi Y.J. // *Clin. Invest*. – 2013. – Vol. 123(5). – P.1881-6.
127. Kelly T. Fibroblast activation protein- α : a key modulator of the microenvironment in multiple pathologies. / Kelly T., Huang Y., Simms A.E. [et al.] // *Int Rev Cell Mol Biol*. – 2012. – Vol. 297. – P.83-116.
128. Kiguchi N. Peripheral interleukin-4 ameliorates inflammatory macrophage-dependent neuropathic pain. / Kiguchi N., Kobayashi Y., Saika F. [et al.] // *Pain*. – 2015. – Vol.156(4). – P.684-93.
129. Kinoshita M. Characterization of two F4/80-positive Kupffer cell subsets by their function and phenotype in mice. / Kinoshita M., Uchida T., Sato A. [et al.] // *J. Hepatol*. – 2010. – Vol. 53(5). – P.903-10.
130. Klein I. Kupffer cell heterogeneity: functional properties of bone marrow derived and sessile hepatic macrophages. / Klein I., Cornejo J.C., Polakos N.K. [et al.] // *Blood*. – 2007. – Vol. 110(12). – P.4077-85.
131. Knittel T. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during hepatic tissue repair in the rat. / Knittel T., Mehde M., Grundmann A. [et al.] // *Histochem. Cell Biol*. – 2000. – Vol. 113. – P. 443–453.
132. Knorre D.A. Cyclosporin A-sensitive cytochrome c release and activation of external pathway of NADH oxidation in liver mitochondria due to pore opening by acidification of phosphate-containing incubation medium. / Knorre D.A., Dedukhova V.I., Vyssokikh M.Y. [et al.] // *Biosci. Rep*. – 2003. – Vol. 23, N.2-3. – P.67-75.

133. Kobayashi N. Treatment of carbon tetrachloride and phenobarbital-induced chronic liver failure with intrasplenic hepatocyte transplantation. / Kobayashi N., Ito M., Nakamura J., Cai J. // Cell transplantation. – 2000. – Vol.9. – P.671–673.
134. Kobayashi Y. Induction of hepatocyte growth by intraportal infusion of hgf into beagle dogs. / Kobayashi Y., Masahiro H., Shinichi U. [et al.] // Biochemical and biophysical research communications. – 1996. – Vol. 220. – P.7–12
135. Köhler C. Expression of Notch-1 and its ligand Jagged-1 in rat liver during liver regeneration. / Köhler C., Bell A.W., Bowen W.C. [et al.] // Hepatology. – 2004. – Vol.39(4). – P.1056-65.
136. Kono S. Marked induction of hepatocyte growth factor mRNA in intact kidney and spleen in response to injury of distant organs / Kono S., Nagaike M., Matsumoto K. [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1992. – Vol. 186(2). – P. 991-998.
137. Kren B.T. Gene Therapy as an Alternative to Liver Transplantation. / Kren B.T., Chowdhury N.R., Chowdhury J.R. [et al.]//Liver Transplantation. – 2002. – Vol 8, No 12. – P. 1089-1108
138. Kung J.W.C. Stem cells and liver repair./ Kung J.W.C , Forbes S.J.// Current Opinion in Biotechnology. – 2009. – Vol. 20. – P. 568–574
139. Ladurner R. Cellular Liver Regeneration after Extended Hepatic Resection in Pigs. / Ladurner R., Traub F., Schenk M. [et al.]// HPB Surgery. – 2009. Article ID 306740, 7 pages.
140. Lambotte L. Control of rate and extent of the proliferative response after partial hepatectomy. / Lambotte L., Saliez A., Triest S. [et al.] // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. – 1997. – Vol.273. – P. 905-912.
141. Lee K.D. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. / Lee K.D. [et al.] // Hepatology. – 2004. – Vol.40. – P. 1275–1284.
142. Lefebvre V. Control of cell fate and differentiation by Sry-related high-mobility-group box (Sox) transcription factors. / Lefebvre V., Dumitriu B., Penzo-

Méndez A. [et al.] //Int. J. Biochem. Cell Biol. – 2007. – Vol.39(12). – P. 2195-214.

143. Lemaigre F.P. Mechanisms of liver development: concepts for understanding liver disorders and design of novel therapies. / Lemaigre F.P. // Gastroenterology. – 2009. – Vol. 137. – P. 62-79.

144. Leri A., Kajstura J., Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. / Leri A., Kajstura J., Anversa P. // Physiol. Rev. – 2005. – Vol. 85, N 4. – P. 1373-1416.

145. Leve L.D. Liver sinusoidal endothelial cells and liver regeneration. / Leve L.D. // J. Clin. Invest. –2013. – 123(5). – P. 1861–1866.

146. Li D.-L. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote hepatic regeneration after partial hepatectomy in rats. / Li D.-L., He X.-H., Zhang S.-A., [et al.] // Pathobiology. – 2013. –N 80. – P. 228–234

147. Li J. Relationships between Deficits in Tissue Mass and Transcriptional Programs after Partial Hepatectomy in Mice. / Li J., Campbell J.S., Mitchell C. [et al.] // The American Journal of Pathology. – 2009. – Vol. 175, No. 3. – P. 947-957

148. Li J. Therapeutic potential of stem cell in liver regeneration./ Li J., Li M., Niu B. [et al.] // Front. Med. – 2011. –Vol. 5(1). –P. 26–32

149. Li Q. In vivo tracking and comparison of the therapeutic effects of MSCs and HSCs for liver injury. / Li Q., Zhou X., Shi Y. [et al.] // PLoS One. –2013. – Vol. 4, N.8: e62363. doi: 10.1371/journal.pone.0062363.

150. Liu T. Autologous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are involved in rat liver regeneration following repeat partial hepatectomy. / Liu T., Mu H., Shen Z. [et al.] // Mol Med Rep. –2016. –13(3). – P. 2053-9.

151. Liu Z.C., Chang T.M. Transdifferentiation of bioencapsulated bone marrow cells into hepatocyte-like cells in the 90% hepatectomized rat model. / Liu Z.C., Chang T.M. // Liver Transpl. – 2006. – Vol. 12(4). – P.566-72.

152. Liu Z.C. Intrasplenic transplantation of bioencapsulated mesenchymal stem cells improves the recovery rates of 90% partial hepatectomized rats. / Liu Z.C.,

- Ming T., Chang S. // Stem Cells International. – Vol. 2012, 2012:697094. doi: 10.1155/2012/697094. Epub 2012 Nov 28
153. Lombardo E. Mesenchymal stem cells as a therapeutic tool to treat sepsis. / Lombardo E., van der Poll T., DelaRosa O. [et al.] // World J. Stem Cells. – 2015. – Vol. 7(2). – P.368-79.
154. Lozito T.P. Human mesenchymal stem cells express vascular cell phenotypes upon interaction with endothelial cell matrix. / Lozito T.P., Kuo C.K., Taboas J.M. [et al.] // J. Cell Biochem. – 2009. – Vol. 107(4). – P.714-22.
155. Lyra A. C. Feasibility and safety of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with advanced chronic liver disease. / Lyra A. C., Soares M. B., da Silva, L.F. [et al.] //World J. Gastroenterol. – 2007. – Vol.13. – P. 1067–1073.
156. Ma H.C. Targeted migration of mesenchymal stem cells modified with CXCR4 to acute failing liver improves liver regeneration. / Ma H.C., Shi X.L., Ren H.Z. [et al.] // World J. Gastroenterol. – 2014. – Vol. 20(40). – P.14884-94.
157. Madrigal M. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. / Madrigal M., Rao K.S., Riordan N.H.// J. Transl Med. – 2014. – Vol.12. – P. 260-8.
158. Malato Y. Fate tracing of mature hepatocytes in mouse liver homeostasis and regeneration. / Malato Y., Naqvi S., Schürmann N. [et al.] //J. Clin. Invest. – 2011. – Vol. 121(12). – P. 4850-4860.
159. Malissen B., Agace W.W., Mowat A.M. Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6C(hi) monocyte precursors. / Malissen B., Agace W.W., Mowat A.M.// Mucosal. Immunol. –2012. – Vol.6. – P. 498-510.
160. Margall-Ducos G. Liver tetraploidization is controlled by a new process of incomplete cytokinesis. / Margall-Ducos G., Celton-Morizur S., Couton D., [et al.] // Journal of Cell Science. – 2007. – Vol. 120. – P. 3633–3639.

161. Martinez F.O., Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. / Martinez F.O., Gordon S.// F1000Prime Rep. – 2014. – Vol.6 (13). – P. 6-13.
162. Marubashi S. Effect of portal hemodynamics on liver regeneration studied in a novel portohepatic shunt rat model. / Marubashi S., Sakon M., Nagano H. [et al.] //M. Surgery. –2004. – Vol.136(5). – P.1028-37.
163. Masson S. Differential regenerative response and expression of growth factors following hepatectomy of variable extent in rats./ Masson S., Daveau M., Hiron M. [et al.] // Liver. – 1999. – Vol.19(4). – P.312-317.
164. Matsuno Y. Hepatocyte growth factor gene transfer into the liver via the portal vein using electroporation attenuates rat liver cirrhosis. / Matsuno Y., Iwata H., Umeda Y. [et al.] // Gene Therapy. – 2003. – Vol.10. – P. 1559–1566.
165. Melgar-Lesmes P. Monocyte-endothelial cell interactions in the regulation of vascular sprouting and liver regeneration in mouse. / Melgar-Lesmes P., Edelman E.R. // J. Hepatol. – 2015. – Vol. 63(4). – P.917-25.
166. Michalopoulos G. K. Liver regeneration after partial hepatectomy, critical analysis of mechanistic dilemmas. / Michalopoulos G. K.//The American Journal of Pathology. – 2010. – Vol. 176, №1 – P. 2–13.
167. Michalopoulos G.K. Advances in liver regeneration. Expert. Rev. Gastroenterol. / Michalopoulos G.K.//Hepatol. –2014. – Vol.8(8). – P. 897-907.
168. Michalopoulos G.K. Liver regeneration. / Michalopoulos G.K. //J. Cell. Physiol. – 2007. – Vol.213, №2. – P. 286–300.
169. Michalopoulos G.K. Liver regeneration: alternative epithelial pathways. / Michalopoulos G.K. //Int. J. Biochem. Cell Biol. – 2011. – Vol. 43(2). – P. 173–179.
170. Michalopoulos G.K. Liver regeneration. / Michalopoulos G.K., De Frances M.C. // Science. – 1997. – Vol.276(5309). – P.60-6.
171. Mitchell C. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor links hepatocyte priming with cell cycle progression during liver regeneration. /

- Mitchell C., Nivison M., Jackson L.F. [et al.] // J. Biol. Chem. – 2005. – Vol.280(4). – P. 2562-2568.
172. Mito M., Kusano. M., Kawaura Y. Hepatocyte transplantation in man. / Mito M., Kusano. M., Kawaura Y.// Transplant. Proc. – 1992. – Vol.24. – P. 3052–3053
173. Monge C. Regulation of respiration in brain mitochondria and synaptosomes: restrictions of ADP diffusion in situ, roles of tubulin, and mitochondrial creatine kinase. / Monge C., Beraud N., Kuznetsov A.V. [et al.] //Mol. Cell Biochem. – 2008. – Vol. 318(1-2). – P. 147-65.
174. Morell C.M. Clin. Res. Hepatol. Notch signalling beyond liver development: emerging concepts in liver repair and oncogenesis. / Morell C.M., Fiorotto R., Fabris L. [et al.] // Gastroenterol. – 2013. – Vol.37(5). –P.447-54.
175. Murray P.J. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. / Murray P.J., Wynn T.A. // Nat. Rev. Immunol. – 2011. – Vol. 11(11). – P. 723-37.
176. Nadal C. Polyploïdie somatique dans le foie de rat I. Le rôle des cellules binucléées dans la genèse des cellules polyploïdes. / Nadal C., Zajdela F.// Experimental Cell Research. – 1966. – Vol.42. – P. 99–116.
177. Nagy P., Teramoto T., Factor V.M., Sanchez A. et al. Reconstitution of liver mass via cellular hypertrophy in the rat. / Nagy P., Teramoto T., Factor V.M. [et al.]// Hepatology. – 2001. – Vol.33, №2. – P. 339–345.
178. Nakajima H. Transplantation of mesenchymal stem cells promotes an alternative pathway of macrophage activation and functional recovery after spinal cord injury. / Nakajima H., Uchida K., Guerrero A.R. [et al.] // J. Neurotrauma. – 2012. – Vol.29(8). – P.1614-25.
179. Nathwani A.C. A review of gene therapy for haematological disorders. / Nathwani A.C., Davidoff A.M., Linch D.C.// Br. J. Haematol. – 2005. – Vol. 128. – P.3–17.
180. Nemeth K. Mesenchymal stem cell therapy for immune-modulation: the donor, the recipient, and the drugs in-between. / Nemeth K.// Exp. Dermatol. – 2014. – Vol. 23(9). – P.625-8.

181. Ninomiya M. Deceleration of regenerative response improves the outcome of rat with massive hepatectomy. / Ninomiya M., Shirabe K., Terashi T. [et al.] // *Am. J. Transplant.* – 2010. – Vol.10(7). – P.1580-1587.
182. Novak M.L. Macrophage phenotypes during tissue repair. *J. Leukoc Biol.* / Novak M.L., Koh T.J.// – 2013. – Vol.93(6). – P. 875-81.
183. Okizaki S. Suppressed recruitment of alternatively activated macrophages reduces TGF- β 1 and impairs wound healing in streptozotocin-induced diabetic mice. / Okizaki S., Ito Y., Hosono K. [et al.]// *Biomed Pharmacother.* – 2015. – Vol.70. – P.317-25.
184. Olle E.W. Matrix Metalloproteinase-9 Is an Important Factor in Hepatic Regeneration After Partial Hepatectomy in Mice./ Olle E.W., Ren X., McClintock Sh.D. [et al.] // *Hepatology.* — 2006. — № 3.Vol. 44. — P. 540-548
185. Ortica S. The 4 Notch receptors play distinct and antagonistic roles in the proliferation and hepatocytic differentiation of liver progenitors. /Ortica S., Tarantino N., Aulner N. [et al.]// *FASEB J.* – 2014. – Vol.28(2). – P. 603-14.
186. Oswald J. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. / Oswald J., Boxberger S., Jørgensen B. [et al.] // *Stem Cells.* – 2004. – Vol.22(3). – P.377-84.
187. Overturf K. Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. / Overturf K., al-Dhalimy M., Ou C.N. [et al.]// *The American journal of pathology.* – 1997. – Vol.151– P. 1273–1280.
188. Pacini S. Are MSCs angiogenic cells? New insights on human nestin-positive bone marrow-derived multipotent cells. / Pacini S., Petrini I. // *Front. Cell Dev. Biol.* – 2014. – Vol.2(20).
189. Pahlavan P.S. Prometheus' challenge: molecular, cellular and systemic aspects of liver. / Pahlavan P.S., Feldmann R.E. Jr., Zavos C. [et al.]// *Journal of Surgical Research.* – 2006. – Vol. 134. – P. 238–251.
190. Palmes D. Animal models of liver regeneration. / Palmes D., Spiegel H.-U.// *Biomaterials.* – 2004. – Vol.25. – P. 1601–1611.

191. Panis Y. Early gene expression associated with regeneration is intact after massive hepatectomy in rats. / Panis Y., Lomri N., Emond J.C. // J. Surg. Res. – 1998. – Vol.79(2). – P. 103-108.
192. Pediaditakis P. The processing and utilization of hepatocyte growth factor/scatter factor following partial hepatectomy in the rat. / Pediaditakis P., Lopez-Talavera J.C., Petersen B. [et al.]// Hepatology. – 2001. –Vol.34. – P. 688–693.
193. Penzo-Méndez A.I. Cell competition in vertebrate organ size regulation. / Penzo-Méndez A.I., Stanger B.Z. // Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol. – 2014. – Vol.3(6). – P.419-27.
194. Petersen B.E. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. / Petersen B.E. [et al.] //Science. – 1999. – Vol.284. – P.1168–70.
195. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. / Pfaffl M.W.// Nucleic Acids Res. – 2001. – Vol. 29(9). – e45.
196. Presta M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. / Presta M., Dell'Era P., Mitola S. [et al.] //Cytokine Growth Factor Rev. – 2005. – Vol.16(2). – P.159-178.
197. Prieto J. Gene therapy of liver diseases./ Prieto J., Qian C., Hernandez-Alcoceba R. [et al.] // Expert Opin Biol Ther. – 2004. – Vol.4(7). – P.1073-91.
198. Prockop D.J. Concise review: two negative feedback loops place mesenchymal stem/stromal cells at the center of early regulators of inflammation. / Prockop D.J.// Stem Cells. – 2013. – Vol.31(10). – P.2042-6.
199. Prockop D.J. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation. / Prockop D.J., Oh J.Y.// Mol. Ther. – 2012. – Vol.20(1) – P.14-20.
200. Rai R.M. Impaired liver regeneration in inducible nitric oxide synthase deficient mice. / Rai R.M., Lee F.Y.J., Rosen A. [et al.]//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1998. – Vol.95 – P. 13829-13834.
201. Rivollier A. Inflammation switches the differentiation program of Ly6Chi monocytes from antiinflammatory macrophages to inflammatory dendritic cells in

- the colon. / Rivollier A., He J., Kole A. [et al.] // J. Exp. Med. – 2012. – Vol.1. – P. 139-155.
202. Rodrigo-Torres D. The biliary epithelium gives rise to liver progenitor cells. / Rodrigo-Torres D., Affò S., Coll M. [et al.] // Hepatology. – 2014. – Vol.60(4). – P. 1367-1377.
203. Rossio V. Adapt or die: how eukaryotic cells respond to prolonged activation of the spindle assembly checkpoint. / Rossio V., Galati E., Piatti S. // Biochem. Soc. Trans. – 2010. – Vol.38, №6. – P. 1645–1649
204. Ruchi Sh. Three-dimensional culture of human embryonic stem cell derived hepatic endoderm and its role in bioartificial liver construction. / Ruchi Sh., Sebastian G., Medine C.N. [et al.] // Journal of Biomedicine and Biotechnology. – Volume 2010, Article ID 236147, 12 pages
205. Russell W.N. Stem Cells in Acute Liver Failure. / Russell W.N., Cameron A.M. // Advances in Surgery. – 2011. – Vol.45. – P.117–130
206. Russo F.P. The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis. / Russo F.P., Alison M.R., Bigger B.W. [et al.] // Gastroenterology. – 2006. – Vol.130(6). – P. 1807–1821.
207. Saclier M. Monocyte/macrophage interactions with myogenic precursor cells during skeletal muscle regeneration. / Saclier M., Cuvellier S., Magnan M., [et al.] // FEBS J. – 2013. – Vol.280(17). – P.4118-30.
208. Salgado S. Liver cirrhosis is reverted by urokinase-type plasminogen activator gene therapy. / Salgado S., Garcia J., Vera J. [et al.] // Molecular Therapy. – 2000. – Vol. 2, No. 6. – P. 545-551
209. Sánchez A. Growth factor- and cytokine-driven pathways governing liver stemness and differentiation. / Sánchez A., Fabregat I. // World J. Gastroenterol. — 2010. – №16, Vol41. – P 5148-5161
210. Sato Y. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. / Sato Y., Araki H., Kato J. [et al.] // Blood. – 2005. – Vol.106(2). – P.756–63.

211. Sawano S. Supplementary immunocytochemistry of hepatocyte growth factor production in activated macrophages early in muscle regeneration. / Sawano S., Suzuki T., Do M.K. [et al.]// Anim. Sci. J. – 2014. – Vol.85(12). – P.994-1000.
212. Scotté M. Cytokine gene expression in liver following minor or major hepatectomy in rat. / Scotté M., Masson S., Lyoumi S. [et al.] //Cytokine. – 1997. – Vol.9(11). – P.859-867.
213. Seo M.J. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. / Seo M.J., Suh S.Y., Bae Y.C. [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2005. –Vol.328.– P. 258-264
214. Shanmukhappa K. Plasmin-mediated Proteolysis Is Required for Hepatocyte Growth Factor Activation during Liver Repair. / Shanmukhappa K., Matte U., Degen J.L [et al.]// The Journal Of Biological Chemistry. – 2009. – №19, Vol. 284. – P. 12917–12923
215. Shi C. Monocyte recruitment during infection and inflammation. / Shi C., Pamer E.G. // Nat. Rev. Immunol. – 2011. – Vol.11. – P. 762-774.
216. Shinichiro O. Potentials of Regenerative Medicine for Liver Disease. / Shinichiro O., Shinichi M.// Surg. Today. – 2009. – Vol.39. P.1019–1025
217. Shyh-Chang N. Lin28 enhances tissue repair by reprogramming cellular metabolism./ Shyh-Chang N. , Zhu H., Yvanka de Soysa T. [et al.]// Cell. –2013. – Vol.155(4). – P.778-92
218. Sigal S.H. Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events. / Sigal S.H., Rajvanshi P, Gorla GR, Sokhi RP [et al.] // American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. – 1999. – Vol. 276. – P.1260–1272.
219. Singla D.K. Fibroblast growth factor-9 enhances M2 macrophage differentiation and attenuates adverse cardiac remodeling in the infarcted diabetic heart. / Singla D.K., Singla R.D., Abdelli L.S. [et al.] //PLoS One. – 2015. Vol.10(3):e0120739.

220. Sirica A.E. Ductular hepatocytes evidence for a bile ductular cell origin in furan-treated rats. / Sirica A.E., Gainey T.W., Mum V.R. // American Journal of Pathology. – 1994. – Vol. 145, No. 2. – P. 375-383
221. Sládek M. Postnatal ontogenesis of the circadian clock within the rat liver. / Sládek M., Jindráková Z., Bendová Z. [et al.] // Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol. – 2006. – Vol. 292. – P. 1224–1229.
222. Sowa J.-P. Extent of liver resection modulates the activation of transcription factors and the production of cytokines involved in liver regeneration. / Sowa J.-P., Best J., Benko T. [et al.] // World J. Gastroenterol. – 2008. – Vol. 14(46). – P. 7093-7100
223. Spiller K.L. Sequential delivery of immunomodulatory cytokines to facilitate the M1-to-M2 transition of macrophages and enhance vascularization of bone scaffolds. / Spiller K.L., Nassiri S., Witherel C.E. [et al.]// Biomaterials. – 2015. – Vol.37. – P.194-207.
224. Stanger B.Z. Cellular homeostasis and repair in the mammalian liver. / Stanger B.Z. // Annu. Rev. Physiol. – 2015. – Vol.77. – P.179-200.
225. Stanger B.Z. Organ size determination and the limits of regulation. / Stanger B.Z. // Cell Cycle. – 2008. – Vol. 7 № 3. – P. 318-324
226. Stocum D.L. Regenerative Biology and Medicine. / Stocum D.L. – 2006. – Elsevier. – 448 p.
227. Strom S.C. Transplantation of human hepatocytes. / Strom S.C., Fisher R.A., Rubinstein W.S. [et al.] //Transplant. Proc. –1997. – Vol.29. – P. 2103–2106.
228. Strom S.C. Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure. / Strom S.C., Fisher R.A., Thompson M. T. [et al.]// Transplantation. – 1997. – Vol.63. – P. 559–569.
229. Suk K.T., Kim D.J. Drug-induced liver injury: present and future. / Suk K.T., Kim D. J.// Clinical and Molecular Hepatology. – 2012. – Vol.18. – P. 249-257

230. Sun S. Differentiation and migration of bone marrow mesenchymal stem cells transplanted through the spleen in rats with portal hypertension. / Sun S., Chen G., Xu M. [et al.] // PLoS One. –2013. – Vol. 8(12): e83523
231. Sung M.W. Intratumoral adenovirus-mediated suicide gene transfer for hepatic metastases from colorectal adenocarcinoma: results of a phase I clinical trial. / Sung M.W., Yeh H.C., Thung S.N. [et al.] //Mol. Ther. –2001. – Vol.4(3). – P.182-91.
232. Tada K. et al. Long-term reduction of serum bilirubin levels in Gunn rats by retroviral gene transfer in vivo. / Tada K., Chowdhury N.R., Neufeld D. [et al.] // Liver Transpl. Surg. –1998. – Vol. 4. –P.78-88
233. Tang J. Mesenchymal stem cells modified with stromal cell-derived factor 1 alpha improve cardiac remodeling via paracrine activation of hepatocyte growth factor in a rat model of myocardial infarction. / Tang J., Wang J., Guo L. [et al.]// Mol. Cells. – 2010. –Vol. 29, N 2. –P. 9 19.
234. Tannuri A.C.A. Experimental models of hepatectomy and liver regeneration using newborn and weaning. / Tannuri A.C.A. Tannuri U., Coelho M.C. [et al.] // Clinics. –2007. –Vol. 62, №6. –P. 757–762
235. Terada T. Expression of matrix proteinases during human intrahepatic bile duct development. A Possible Role in Biliary Cell Migration. / Terada T., Kitamura Y., Nakanuma Y.// American Journal of Pathology. –1995. –Vol. 147, N. 5 – P.1207—1212.
236. Terada T., Kitamura Y., Nakanuma Y. Normal and abnormal development of the human intrahepatic biliary system: a review. / Terada T., Kitamura Y., Nakanuma Y.// Tohoku J. Exp. Med. –1997. –N 181. – P. 19—32.
237. Terai S. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. / Terai S., Ishikawa T., Omori K., [et al.] // Stem cells. –2006 (Dayton, Ohio). – Vol. 24 . – P. 2292–2298.

238. Thomas J.A. Macrophage therapy for murine liver fibrosis recruits host effector cells improving fibrosis, regeneration, and function. / Thomas J.A., Pope C., Wojtacha D. [et al.] // *Hepatology*. – 2011. – Vol. 53(6). – P. 2003-15.
239. Tian Y. Kupffer cell-dependent TNF- α signaling mediates injury in the arterialized small-for-size liver transplantation in the mouse. / Tian Y., Jochum W., Georgiev P. [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2006. – Vol.103(12). – P.4598-603.
240. Timchenko N.A. Aging and liver regeneration. / Timchenko N.A. // *Trends in Endocrinology & Metabolism*. – 2009. – №4, Vol.20. – P. 171–176.
241. Timchenko N.A. CCAAT/enhancer binding protein α regulates p21 protein and hepatocyte proliferation in newborn mice. / Timchenko N.A., Harris T.E., Wilde M. [et al.] // *Mol. Cell Biol*. – 1997. – Vol.17, №12. – P. 7353–7361.
242. Timchenko N.A., Wilde M., Darlington G.J. C/EBP α regulates formation of S-phase-specific E2F-p107 complexes in livers of newborn mice. / Timchenko N.A., Wilde M., Darlington G.J. // *Mol. Cell Biol*. – 1999. – Vol.19, №4. – P. 2936–2945.
243. Tirnitz-Parker J.E. Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis is a mitogen for liver progenitor cells. / Tirnitz-Parker J.E., Viebahn C.S., Jakubowski A. [et al.] // *Hepatology*. – 2010. – Vol. 52. – P.291-302.
244. Tögel F., Westenfelder C. The role of multipotent marrow stromal cells (MSCs) in tissue regeneration. *Organogenesis* 2011; 7(2): 96–100.
245. Tomiya T. The mitogenic activity of hepatocyte growth factor on rat hepatocytes is dependent upon endogenous transforming growth factor- α . / Tomiya T., Ogata I., Yamaoka M. [et al.] // *American Journal of Pathology*. — 2000. — Vol. 157, No. 5. — P. 1693-701
246. Toshima T. Suppression of autophagy during liver regeneration impairs energy charge and hepatocyte senescence in mice. / Toshima T., Shirabe K., Fukuhara T. et al. // *Hepatology*. – 2014. – Vol.60, N1. – P. 290-300

247. Tsutsui H. Importance of Kupffer cells in the development of acute liver injuries in mice. / Tsutsui H., Nishiguchi S. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2014. – Vol. 15(5). – P.7711-30.
248. Tsutsumi R. Selective suppression of initial cytokine response facilitates liver regeneration after extensive hepatectomy in rats. / Tsutsumi R., Kamohara Y., Eguchi S. [et al.] // *Hepatogastroenterology*. –2004. –Vol.51(57). – P.701-4.
249. Uygun B.E. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. / Uygun B.E., Soto-Gutierrez A., Yagi H. [et al.] // *Nat. Med.* – 2010. – Vol.16(7). – P. 814–820.
250. Vallabhaneni K.C. Vascular smooth muscle cells initiate proliferation of mesenchymal stem cells by mitochondrial transfer via tunneling nanotubes. / Vallabhaneni K.C., Haller H., Dumler I.// *Stem Cells Dev.* – 2012. – Vol.21, N. 17. – P. 3104-3013.
251. Vandesompele J. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. / Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F. [et al.]//*Genome Biol.* – 2002. – Vol.3(7). – RESEARCH0034.
252. Vater C. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. / Vater C., Kasten P., Stiehler M.// *Acta Biomater.* –2011. – Vol.7(2). – P. 463-77.
253. Vittorio O. Endothelial differentiation of mesenchymal stromal cells: when traditional biology meets mechanotransduction. / Vittorio O., Jacchetti E., Pacini S. [et al.] // *Integr Biol (Camb)*. –2013. – Vol.5(2). – P. 291-9.
254. Wang L. Liver sinusoidal endothelial cell progenitor cells promote liver regeneration in rats. / Wang L., Wang X., Xie G. [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2012. – Vol. 122(4). – P.1567-73.
255. Wang X. of SOX9 promotes cell proliferation, migration and invasion in lung adenocarcinoma. / Wang X., Ju Y., Zhou M.I. [et al.]// *Oncol. Lett.* –2015. – Vol.10(2). – P. 990-994.

256. Watt S.M. The angiogenic properties of mesenchymal stem/stromal cells and their therapeutic potential. / Watt S.M., Gullo F., vander Garde M. [et al.]// Br.Med.Bull. –2013. – Vol.108. –P. 25–53.
257. Weinbren K. The mitotic response after subtotal hepatectomy in the rat. / Weinbren K., Taghizadeh A.// Br. J. Exp. Pathol. – 1965. – Vol.46(4). – P. 413-417.
258. Wells R.G. Origin and function of myofibroblasts in the liver. / Wells R.G., Schwabe R.F.// Semin Liver Dis. – 2015. – Vol. 35(2). – P.97-106.
259. Wermuth P.J. The significance of macrophage polarization subtypes for animal models of tissue fibrosis and human fibrotic diseases. / Wermuth P.J., Jimenez S.A. // Clin. Transl. Med. – 2015. – Vol.4(2). eCollection 2015.
260. Wilson D.F. Azide inhibition of mitochondrial electron transport. I. The aerobic steady state of succinate oxidation. / Wilson D.F., Chance B. // Biochim. Biophys. Acta. –1967. – Vol. 131(3). – P. 421-30.
261. Wojtczak L. Assay for the intactness of the outer membrane in isolated mitochondria. / Wojtczak L., Zaluska H., Wroniszewska A. [et al.]// Acta biochimica Polonica. –1971. – Vol. 19(3). – P. 227-34
262. Wu J. Interaction of NG2(+) glial progenitors and microglia/macrophages from the injured spinal cord. / Wu J., Yoo S., Wilcock D. [et al.]// Glia. – 2010. – Vol.58. – P. 410-422.
263. Wu X.-B. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells. / Wu X.-B., Ran T. // Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int. – 2012. – Vol. 11, No 4. – P. 60193-3
264. Xiang S. Oval cell response is attenuated by depletion of liver resident macrophages in the 2-AAF/partial hepatectomy rat. / Xiang S., Dong H.H., Liang H.F. [et al.] // PLoS One. – 2012. – Vol.7(4). – e35180.
265. Xu C.S. The role of Kupffer cells in rat liver regeneration revealed by cell-specific microarray analysis. / Xu C.S., Jiang Y., Zhang L.X. [et al.] // Cell Biochem. –2012. – Vol.113(1). – P.229-37.

266. Yamamoto H. Differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes: biological functions and therapeutic application. / Yamamoto H., Quinn G., Asari A. [et al.] // *Hepatology*. –2003. – Vol.37. – P. 983–993.
267. Yamazaki S. Ontogeny of circadian organization in the rat. / Yamazaki S., Yoshikawa T., Biscoe E.W. [et al.] // *Biol. Rhythms*. – 2009. – Vol. 24, №1. – P. 55–63.
268. Yanagita K. Lung may have an endocrine function producing hepatocyte growth factor in response to injury of distal organs. / Yanagita K., Nagaike M., Ishibashi H. // *Biochem Biophys. Res. Commun.* –1992. – Vol.182(2). – P. 802-809.
269. Yanger K. Adult hepatocytes are generated by self-duplication rather than stem cell differentiation. / Yanger K., Knigin D., Zong Y. [et al.] // *Cell Stem Cell*. – 2014. – Vol.15(3). – P.340-9.
270. Yanger K. Robust cellular reprogramming occurs spontaneously during liver regeneration. / Yanger K., Zong Y., Maggs L.R. [et al.] // *Genes Dev.* – 2013. – Vol.27(7). – P. 719-724.
271. Yimlamai D. Hippo pathway activity influences liver cell fate. / Yimlamai D., Christodoulou C., Galli G.G. [et al.]// *Cell*. –2014. – Vol. 157(6). – P.1324-38.
272. Yin L. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiated into hepatocyte-like cells in vivo and in vitro. / Yin L., Zhu Y., Yang J. [et al.] // *Mol. Med. Rep.* – 2015. – Vol.11(3). – P.1722-32.
273. Yin S. Enhanced liver regeneration in IL-10-deficient mice after partial hepatectomy via stimulating inflammatory response and activating hepatocyte STAT3. / Yin S., Wang H., Park O. [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2011. – Vol.178(4). – P. 1614-1621.
274. Yock Y. D. Clinical uses of liver stem cells liver stem cells: Methods and Protocols. / Yock Y. D.// *Methods in Molecular Biology* (Takahiro Ochiya (ed.)). – 2012. – Vol. 826

275. You Q. Role of hepatic resident and infiltrating macrophages in liver repair after acute injury. / You Q., Holt M., Yin H. [et al.] // *Biochem Pharmacol.* – 2013. – Vol.86(6). – P.836-43.
276. Yovchev M.I. Identification of adult hepatic progenitor cells capable of repopulating injured rat liver. / Yovchev M.I., Grozdanov P.N., Zhou H. [et al.] // *Hepatology.* –2008. –Vol. 47, No. 2. – P. 637-647
277. Yu Y. Cell Therapies for Liver Diseases. / Yu Y., Fisher J. E., Lillegard J.B. [et al.] // *Liver transplantation.* –2012. – Vol.18. – P. 9-21.
278. Zemel R. Expression of liver-specific markers in naïve adipose-derived mesenchymal stem cells. / Zemel R., Bachmetov L., Ad-El D. [et al.] // *Liver Int.* – 2009. – Vol. 29. – P. 1326–1337.
279. Zeng S. Opposing roles of RAGE and Myd88 signaling in extensive liver resection. / Zeng S., Zhang Q.Y., Huang J. [et al.] // *FASEB J.* – 2012. – Vol.26(2). – P.882-93.
280. Zhang W. Hepatic non-parenchymal cells and extracellular matrix participate in oval cell-mediated liver regeneration. / Zhang W. // *World J. Gastroenterol.* –2009. –Vol. 15, №5. – P. 552–560.
281. Zhang Y. ROS play a critical role in the differentiation of alternatively activated macrophages and the occurrence of tumor-associated macrophages./ Zhang Y., Choksi S., Chen K. [et al.] // *Cell Res.* – 2013. – Vol.23, N 7. – P.898-914
282. Zhang Y. Mitochondrial respiration regulates adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. / Zhang Y., Marsboom G., Toth P.T. // *PloS one.* – 2013. – Vol.8, N 10. – e77077.
283. Zhong L. The anti-fibrotic effect of bone morphogenic protein-7(bmp-7) on liver fibrosis. / Zhong L., Wang X., Wang S. [et al.] // *International Journal of Medical Sciences.* – 2013. – Vol.10(4). – P. 441-450.
284. Zigmond E. Infiltrating monocyte-derived macrophages and resident Kupffer cells display different ontogeny and functions in acute liver injury. /

- Zigmond E., Samia-Grinberg S., Pasmanik-Chor M. [et al.] // J. Immunol. – 2014. – Vol.193(1). – P. 344-53.
285. Zong Y. Notch signaling controls liver development by regulating biliary differentiation. / Zong Y., Panikkar A., Xu J. [et al.] // Development. – 2009. – Vol.136(10). – P.1727-39.
286. Zorn A.M. Liver development (October 31, 2008), StemBook, ed. The Stem Cell Research Community, StemBook, doi/10.3824/stembook.1.25.1, <http://www.stembook.org>
287. Zou Y. Four waves of hepatocyte proliferation linked with three waves of hepatic fat accumulation during partial hepatectomy-induced liver regeneration. / Zou Y., Bao Q., Kumar S. [et al.] // PLoS ONE. –2012. – Vol.7(2). – e30675.