

На правах рукописи

Ельчанинов

Андрей Владимирович

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ
РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ ПОСЛЕ СУБТОТАЛЬНОЙ РЕЗЕКЦИИ В
ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Москва – 2017

Работа выполнена в ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека» и ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный консультант:

доктор медицинских наук, доцент **Фатхудинов Тимур Хайсамудинович**

Официальные оппоненты:

Главный научный сотрудник отдела биомедицинских технологий и тканевой инженерии ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, доктор медицинских наук, профессор **Онищенко Нина Андреевна**

Профессор кафедры морфологии и общей патологии института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет,
доктор медицинских наук, доцент **Гумерова Аниса Азатовна**

Ведущий научный сотрудник лаборатории редактирования генома ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» ФМБА России,
доктор медицинских наук **Темнов Андрей Александрович**

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации (394036, г. Воронеж, ул. Студенческая, д. 10)

Защита состоится _____ 2017 года в _____ часов на заседании диссертационного совета (Д 001.004.01) Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека» по адресу: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д.3

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека» и на сайте <http://www.morfolhum.ru/>

Автореферат разослан «___» _____ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, доктор медицинских наук

Л.П. Михайлова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

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 IL6 [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 [Furuuama 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: большая 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 - TNF α 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 – 3-48 ч (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, повышение 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, цитохимическое и иммуноцитохимическое окрашивание, обзорное и иммуногистохимическое окрашивание, морфометрические методы, световая и флуоресцентная 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 (26-30 May, 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 2016 г.).

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, входящих в Перечень РФ рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и ученой степени доктора наук.

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 источников из них 20 отечественных и 267 зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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

Модель регенерации печени. У крыс, наркотизированных диэтиловым эфиром, проводили субтотальную резекцию печени. Для этого удаляли срединную, левую боковую и правую верхнюю доли печени (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, 72 ч, 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 лапаротомию, 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.

Получение клеточных культур и культивирование МСК пупочного канатика крыс. МСК пупочного канатика крысы получали из вартонова студня обработкой 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 после второго пассирования.

Проточная цитофлуометрия. 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.

Оценка дифференцировочного потенциала. При достижении клетками 70-80% конfluence на 3 пассаже культуральную среду заменяли на дифференцировочную для оценки адипогенеза, хондрогенеза, остеогенеза. Ангиогенные свойства МСК изучали на полимеризованном матриксе. Формируемые в матриксе структуры окрашивали с помощью антител к CD31, который является маркером эндотелия.

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, 48 ч, 3, 7 или 10 суток после трансплантации.

Биохимические методы. Концентрацию альбумина определяли с помощью фотометрического теста с бромкрезоловым зеленым (Albumin DiaS, Диакон-ДС, Россия), активность АЛТ – с помощью фотометрического теста (ALAT(GPT Dias) Диакон-ДС, Россия).

Гистологическое исследование. 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.

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

Иммуногистохимическое исследование. Иммуногистохимическое исследование проводили с использованием иммунопероксидазного и иммунофлуоресцентного метода. На препаратах подсчитывали клетки, окрашенные с помощью соответствующих антител (Таблица 1), затем вычисляли индексы - отношение окрашенных клеток к их общему числу.

Таблица1. Иммуногистохимические маркеры

Ki-67	маркер пролиферации
CD68	общий маркер макрофагов
CD206	маркер M2a, M2c макрофагов
CX3CR1	маркер макрофагов костномозгового происхождения
CK19	маркер холангиоцитов
CK18	маркер гепатоцитов
SOX9	маркер малодифференцированных клеток
FAPalpha	маркер активных фибробластов
CD31	маркер эндотелиоцитов
alphaSMA	маркер гладких миоцитов
TWEAKR (Fn14)	антитела к рецептору цитокина TWEAK
TGF β	антитела к трансформирующему фактору роста β
TNFα	антитела к фактору некроза опухолей α
Caspase3	антитела к каспазе 3 - маркер апоптоза
betaTubulin	антитела к β-тубулину

Вестерн-блот анализ. Количество белка в регенерирующей печени определяли методом вестерн-блот гибридизации с применением коммерческих готовых наборов реактивов. Мембраны с выделенным белком окрашивали первыми антителами к соответствующему белку в разведении 1:100 или антителами к β -тубулину, который служил референсным белком (1:100, Abcam, Великобритания). Анализ полученных результатов проводили в программе ImageLab (Bio-Rad Laboratories, Inc., США).

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.

Оценка клеточной гибели. Оценку клеточной гибели в динамике регенерации печени осуществляли с помощью метода TUNEL и путем изучения экспрессии каспазы 3.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени. 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. При изучении легких и почек контролем служили органы интактных животных. Для анализа экспрессии генов использовали метод определения порогового цикла (Ct) и вычисления относительной экспрессии гена по методу M.V. Pfaffl [2001] с учетом рекомендаций J. Vandesompele [Vandesompele J. et al., 2002]. В качестве эндогенного контроля были выбраны гены домашнего хозяйства *actin- β* , *b2m*, *gapdh*.

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 изучали экспрессию 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 - *tgfb β* . Ремоделирование межклеточного матрикса оценивали по экспрессии гена металлопротеиназы 9 - *mmp9*. Молекулярные механизмы миграции стромальных клеток, предшественников эндотелиоцитов и лимфоцитов в печень исследовали с помощью экспрессии гена *sdf1 α* (stromal cell-derived factor 1 α), неоваскулогенеза - гена эндотелиального фактором роста (*vegf*) 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 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*, *uap1*. 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)

Таблица 2. Функциональные группы исследуемых генов

Провоспалительные цитокины 1. Интерлейкин 1β - <i>il1\beta</i> , 2. Интерлейкин - <i>il6</i> , 3. Фактор некроза опухоли – <i>tnfa</i>	Пролиферация гепатоцитов 1. Фактор роста гепатоцитов - <i>hgf</i> , 2. Трансформирующий фактор роста β - <i>tgfb</i> , 3. Фактор роста фибробластов 2 - <i>fgf2</i>
Противовоспалительные цитокины 1. Интерлейкин 10 - <i>il10</i>	Факторы миграции клеток 1. Матричная металлопротеиназа-9 <i>mtmp9</i> , 2. <i>sdf1a</i>
NOTCH-сигналинг - сигнальный путь, регулирующий пролиферацию и дифференцировку гепатоцитов и холангиоцитов 1. <i>Notch1</i> , <i>notch2</i> – мембранные рецепторы, 2. <i>Sox9</i> , <i>hes1</i> , <i>uap1</i> – транскрипционные факторы, экспрессия которых зависит от активности NOTCH-рецепторов	Факторы ангиогенеза 1. Эндотелиальный фактор роста - <i>vegfb</i> , 2. Ангиогенин - <i>ang</i>
TWEAK-сигналинг – сигнальный путь, регулирующий активность прогениторных клеток печени и пролиферацию холангиоцитов 1. <i>Tweak</i> – ген секретируемого фактора TWEAK, относящийся к семейству TNF белков 2. <i>Fn14</i> – ген рецептора к TWEAK	Маркеры макрофагов 1. Индуцируемая <i>iNOs</i>
Гены домашнего хозяйства, эндогенный контроль	<i>actb</i> , <i>b2m</i> , <i>gapdh</i>

Оценку функционального состояния митохондрий проводили на митохондриях, выделенных методом дифференциального центрифугирования [Knorre D.A. et al., 2003]. Функциональное состояние митохондрий оценивали по скорости потребления кислорода при температуре 25°C с помощью оксиграфа (Hansatech, UK). В выделенных митохондриях определяли содержание цитохромов типов a, b и c.

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 $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ДИНАМИКА РЕПАРАТИВНОГО ПРОЦЕССА В ПЕЧЕНИ ПОСЛЕ СУБТОТАЛЬНОЙ РЕЗЕКЦИИ У КРЫС

Смертность животных после субтотальной резекции составила 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 являлась острая печеночно-клеточная недостаточность, что подтверждается снижением концентрации альбумина и повышением активности АЛТ в сыворотке крови оперированных крыс через 3 суток после субтотальной резекции по сравнению с контролем ($p < 0,05$, Рис.2 а,б).

Через 10 суток после резекции масса печени у подопытных животных не отличалась от массы печени интактных крыс ($p > 0,05$, Рис. 1). В этот срок концентрация альбумина и активность АЛТ в сыворотке крови оперированных крыс не отличались от показателей в контроле ($p > 0,05$, Рис. 2 а,б). Таким образом, регенерация печени крыс после субтотальной резекции завершалась в течение 10 суток.

Наибольший прирост массы печени происходил между 3 и 7 сутками после резекции, при этом к 7 суткам наблюдалось восстановление биохимических показателей функции печени. Полученные результаты согласуются с данными других исследователей [Ninomiya M. et al., 2010]. Сроки восстановления массы печени после субтотальной резекции в целом соответствуют времени регенерации печени после удаления 70% массы органа - частичной гепатэктомии [Michalopoulos G.K., DeFrances M.C., 1997].

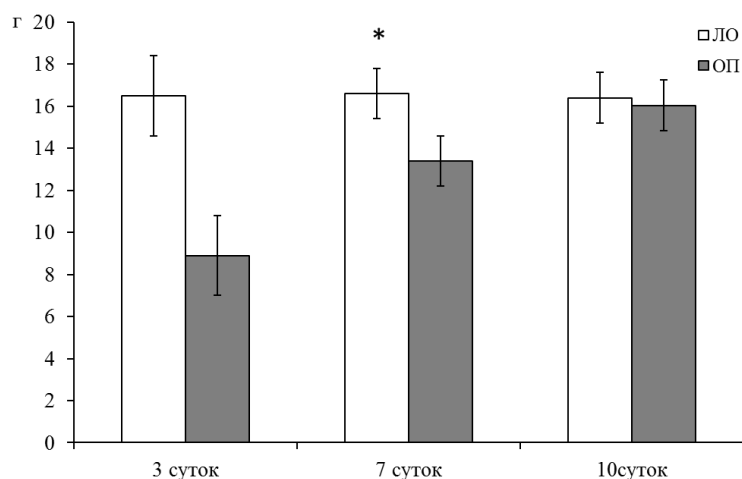


Рис.1. Восстановление массы печени у крыс после субтотальной резекции. Белые столбики – ложно оперированные, серые – оперированные, по оси абсцисс – срок после операции, по оси ординат – масса печени в г, представлены средние значения с доверительными интервалами, * - статистически значимые различия между оперированными и ложно оперированными животными ($p<0,05$).

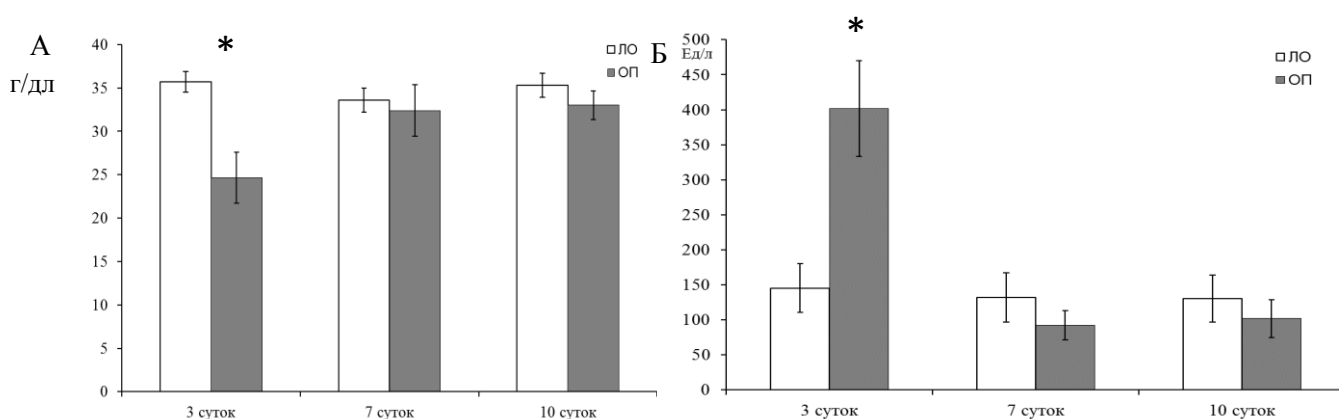


Рис. 2. Восстановление функциональных показателей печени после субтотальной резекции. А. Динамика уровня альбумина в сыворотке крови после субтотальной резекции, по оси абсцисс – срок после операции, по оси ординат – концентрация альбумина в г/дл. Б. – Динамика активности АЛТ в сыворотке крови оперированных 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 ($p<0,05$)

ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕПАТОЦИТОВ ПЕЧЕНИ КРЫС ПОСЛЕ СУБТОТАЛЬНОЙ РЕЗЕКЦИИ

В первые сутки после резекции печени митотически делящиеся гепатоциты отсутствовали (Рис.4б). Единичные гепатоциты, экспрессирующие Ki-67, появлялись только через 30 ч после субтотальной резекции, а митозы - через 48 ч (Рис.3а,б, Рис.4в). Наибольших значений митотический индекс (МИ) гепатоцитов достигал через 48-72 ч и 7 суток после операции (Рис.3а), максимальное значение индекса Ki-67 (Ин Ki-67) наблюдалось через 48 ч после операции (Рис.3б, Рис.4г). Причиной позднего начала пролиферации гепатоцитов после удаления 80% массы печени является, вероятно, блок митотического цикла при переходе из G0 в G1, и при выходе клеток из G2-периода [Романова Л.К., 1984].

Полученные данные свидетельствуют о том, что в течение 30 ч после субтотальной резекции наблюдался скорее блок при переходе из G0 в G1, поскольку в гепатоцитах отсутствовала экспрессия Ki-67. При нарушении митотического цикла при переходе из G2-периода в митоз происходит накопление Ki-67+ гепатоцитов в сочетании со снижением МИ, что обнаружено через 5 суток после субтотальной резекции (Рис. 3а,б).

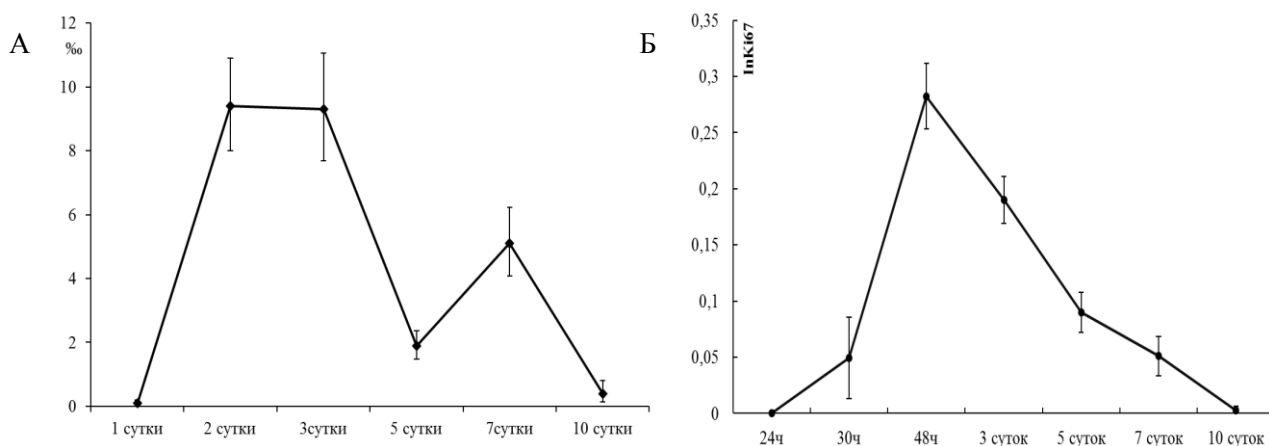


Рис.3. Пролиферация гепатоцитов после субтотальной резекции печени. А. Митотическая активность гепатоцитов. По оси ординат – митотический индекс в ‰. Б. Динамика индекса Ki-67, по оси ординат – индекс Ki-67. По оси абсцисс – срок после операции, представлены средние значения с доверительными интервалами.

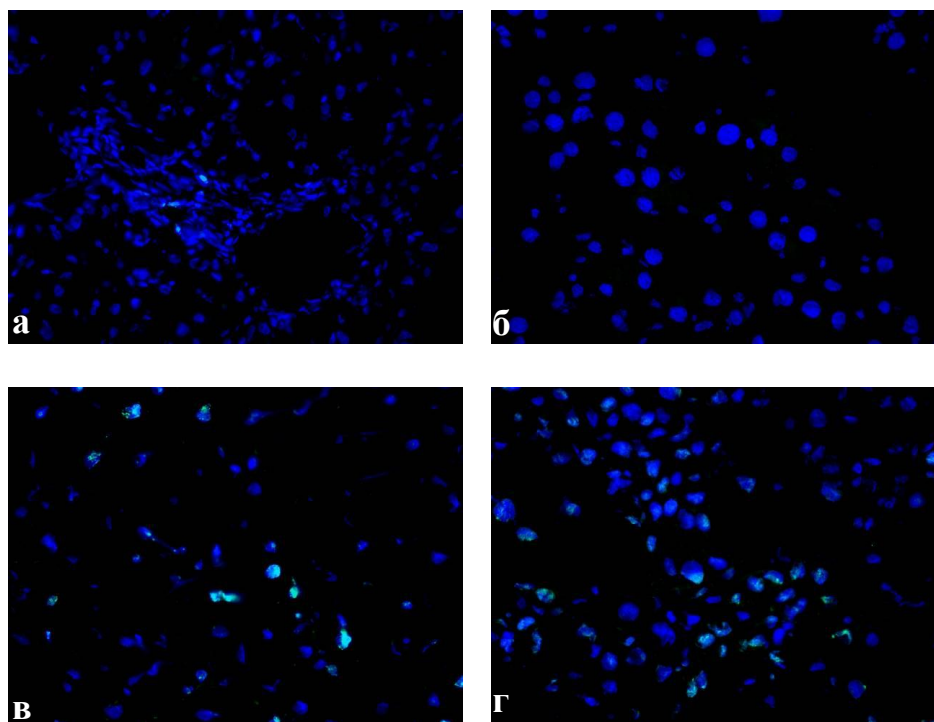


Рис.4. Экспрессия Ki-67 в регенерирующей печени крыс после субтотальной резекции. Иммуногистохимическое исследование: а – интактный контроль, б – через 24 ч после субтотальной резекции, в – через 30 ч после субтотальной резекции, г – через 48 часов после операции. Флуоресцентная микроскопия: маркер Ki-67 визуализировался с помощью вторых антител, конъюгированных с FITC - зеленое свечение, докраска ядер DAPI – синее свечение, $\times 400$.

РОЛЬ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ КРЫС ПОСЛЕ СУБТОТАЛЬНОЙ РЕЗЕКЦИИ

Уровень клеточной гибели оценен с помощью метода TUNEL, а также с помощью антител к каспазе 3. На всех сроках эксперимента гибнущие гепатоциты отсутствовали. Экспрессия гена *tnfa* в печени после субтотальной резекции повышалась однократно и только на позднем этапе регенерации (Рис.6б), с этим согласуются данные по содержанию белка TNFa в регенерирующей печени крыс (Рис. 8а,б). По мнению ряда авторов, синдром малого остатка печени после субтотальной резекции и высокая смертность подопытных животных связана с апоптотической гибелью гепатоцитов [Eshkenazy R. et al., 2014], вызванным избыточной синтезом TNFa, который считается главным индуктором апоптоза гепатоцитов [Tian Y. et al., 2006]. Однако полученные данные не подтверждают ведущую роль апоптоза и TNFa в повреждении печени после субтотальной резекции.

ДИНАМИКА ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ РЕГУЛЯТОРНЫХ МОЛЕКУЛ В ПЕЧЕНИ ПОСЛЕ СУБТОТАЛЬНОЙ РЕЗЕКЦИИ

В зависимости от реакции на субтотальную резекцию печени все рассматриваемые гены (Таблица 2) можно разделить на три группы (Рис.5, Рис.6, Рис.7). Первая группа объединяет гены, экспрессия которых достоверно повышалась по сравнению с контролем в ранний период (3-48 ч) регенерации печени после выполняемой операции. К этим генам относятся гены провоспалительного цитокина *il6* и противовоспалительно цитокина *il10*, маркера макрофагов *iNOs*, матричной металлопротеиназы *mtmp9*, факторов роста, влияющих на пролиферацию гепатоцитов *fgf2*, *tgfb*, рецептора TWEAK *fn14*, ген-маркер недифференцированных клеток *sox9* (Рис.5). 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.6). 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.7).

Фактором, нарушающим течение регенерации печени после субтотальной резекции, является блок митотического цикла в течение 30 ч после операции. Задержка начала пролиферации могла происходить вследствие сниженной экспрессии цитокинов, прежде всего TNF α и интерлейкина И6, 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 β , который обладает антипролиферативной активностью [Michalopoulos G.K., 2014].

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 (Рис.5а). Повышения содержания TGF β в печени после субтотальной резекции не выявлено. Экспрессия гена *tgfb* увеличивалась через 6 ч после субтотальной резекции (Рис.6е). Содержание белка TGF β в печени после субтотальной резекции статистически значимо снижалось через 2 и 3 суток и восстанавливалось по сравнению с контролем к 7 суткам (Рис.8в,г).

На ранних сроках после субтотальной резекции отсутствовало повышение экспрессии гена фактора некроза опухолей α *tnfa* (Рис.5,6), который участвует в инициации пролиферации гепатоцитов, и гена фактора роста гепатоцитов *hgf*, который является главным митогеном в

печени. При этом после на 2, 3 и 7 суток после субтотальной резекции в печени достоверно снижалось количество TNF α и HGF (Рис.8а,б, Рис.9).

В ткани интактной печени содержится большое количество HGF. После удаление 70% массы печени через 3 ч после операции наблюдалось снижение концентрации HGF в печени, однако его содержание быстро восстанавливалось к 72 ч после повреждения [Michalopoulos G.K., De Frances M.C., 1997]. Уменьшение содержания HGF происходит по двум 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 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.

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

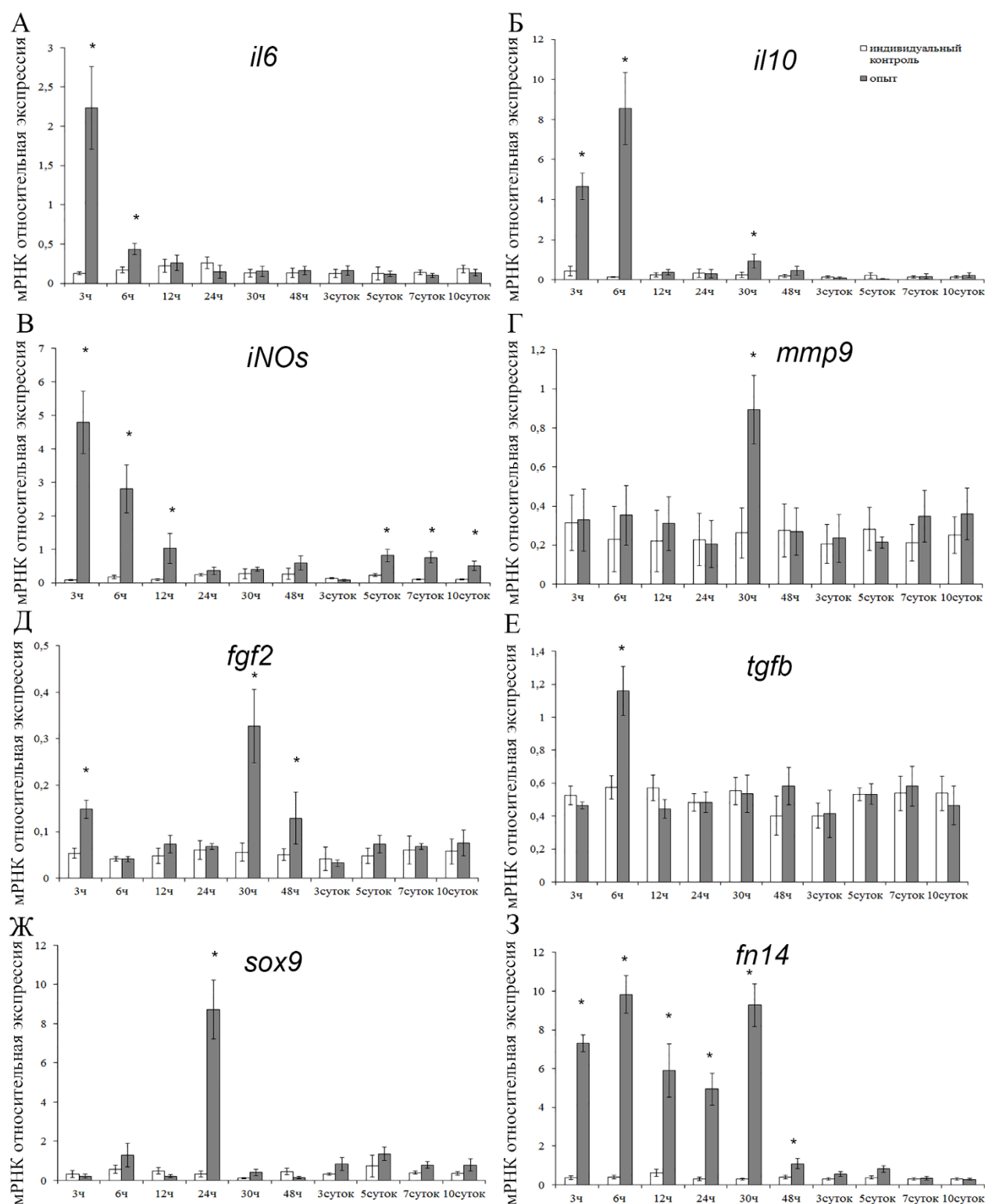


Рис.5 Экспрессия генов регуляторных молекул, активность которых была повышена через 3-48 ч после субтотальной резекции. По оси абсцисс – срок после операции, по оси ординат – относительная экспрессия генов. Белые столбики – индивидуальный контроль, серые столбики – опыт, данные представлены в виде средних и доверительных интервалов, * - статистически

значимые различия между оперированными и индивидуальным контролем ($p<0,05$).

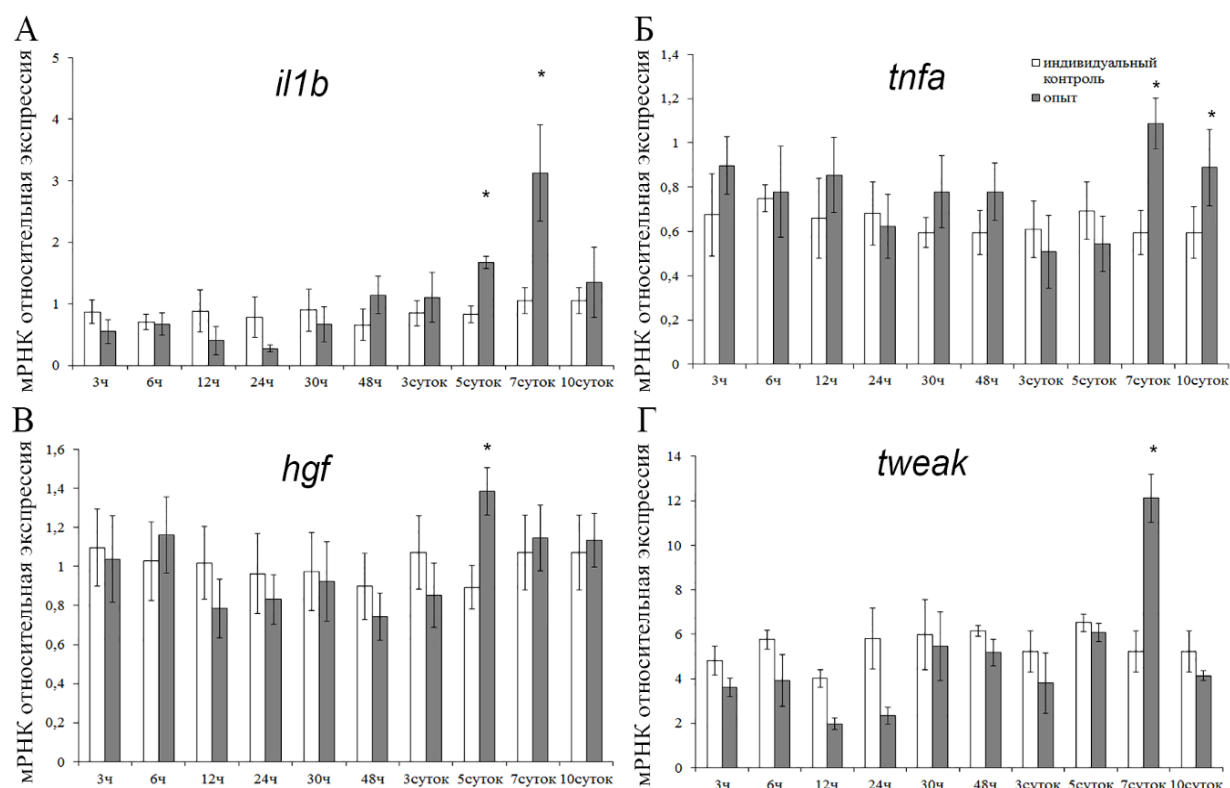


Рис.6 Экспрессия генов регуляторных молекул, активность которых была повышена через 5-10 суток после субтотальной резекции. По оси абсцисс – срок после операции, по оси ординат – относительная экспрессия генов. Белые столбики – индивидуальный контроль, серые столбики – опыт, данные представлены в виде средних и доверительных интервалов, * - статистически значимые различия между оперированными и индивидуальным контролем ($p<0,05$).

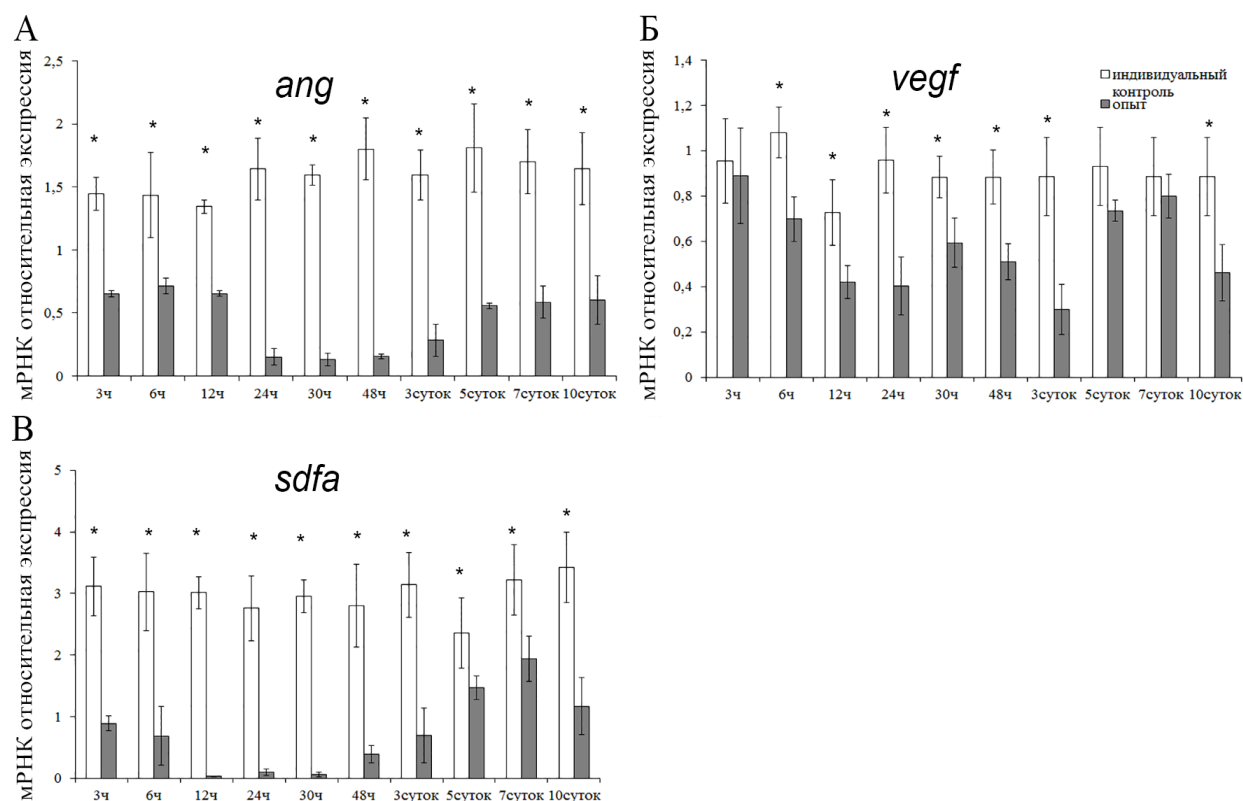
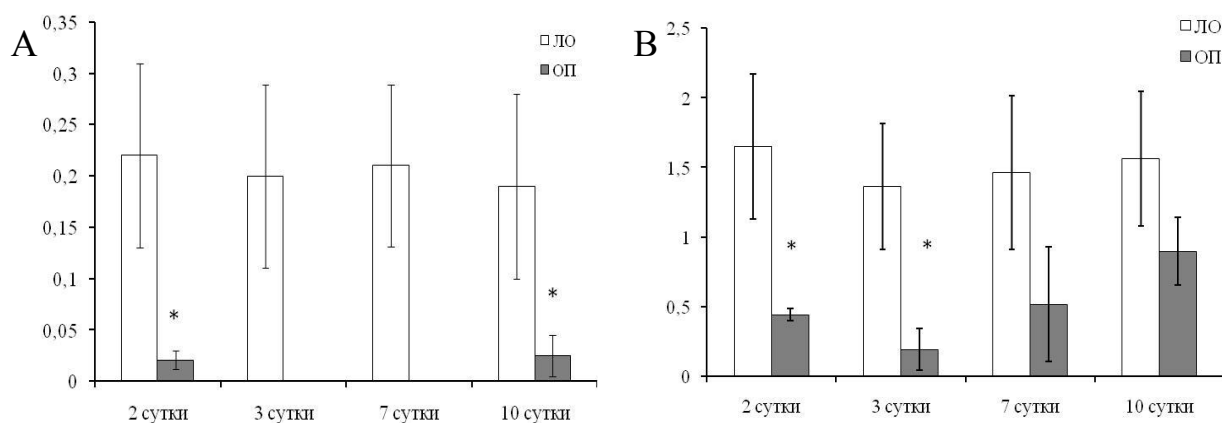


Рис.7 Экспрессия генов регуляторных молекул, активность которых была снижена после субтотальной резекции. По оси абсцисс – срок после операции, по оси ординат – относительная экспрессия генов. Белые столбики – индивидуальный контроль, серые столбики – опыт, данные представлены в виде средних и доверительных интервалов, * - статистически значимые различия между оперированными и индивидуальным контролем ($p < 0,05$).



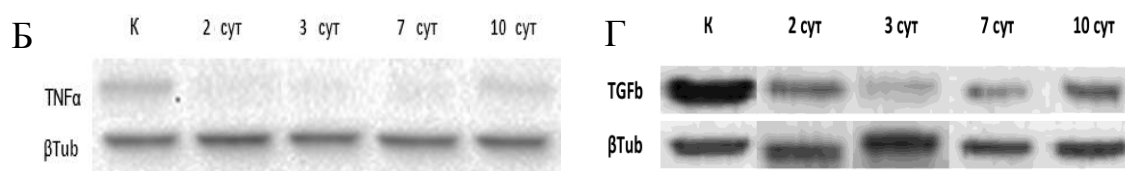


Рис. 8 Вестерн-блот белков TNFα и TGFβ в печени крыс в разные сроки после субтотальной резекции. А. Денситометрический анализ вестерн-блота TNFα. Б. Вестерн-блот TNFα. Вестерн-блот белка TGFβ в печени крыс после субтотальной резекции. А. Денситометрический анализ вестерн-блота TNFα. Б. Вестерн-блот TGFβ.

По оси абсцисс – время после операции, по оси ординат – относительная экспрессия белка.

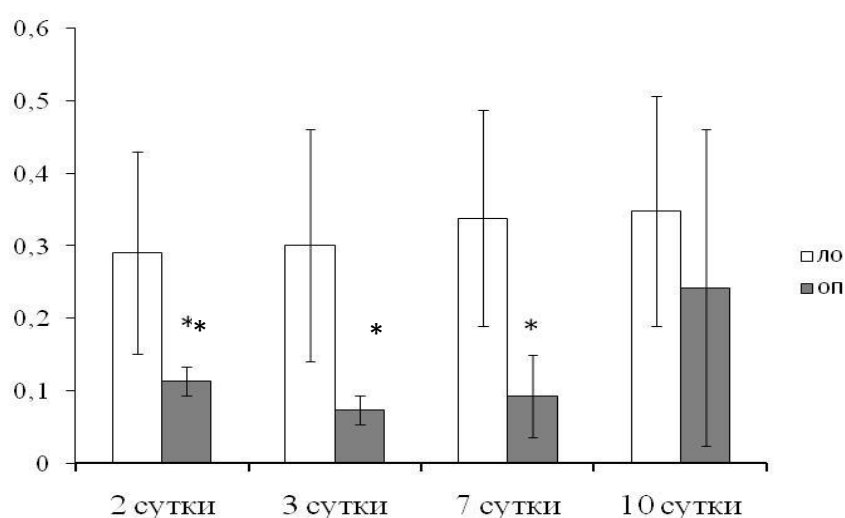


Рис. 9. ИФА белка HGF в печени крыс в разные сроки после субтотальной резекции. Белые столбики – ложно оперированные животные (ЛО), серые столбики – оперированные животные (ОП). Данные представлены в виде средних и доверительных интервалов. По оси абсцисс – время после операции, по оси ординат – содержание белка HGF в гомогенате печени, нормированное на общий белок. * - статистически значимые различия между оперированными и ложно оперированными животными ($p < 0,05$).

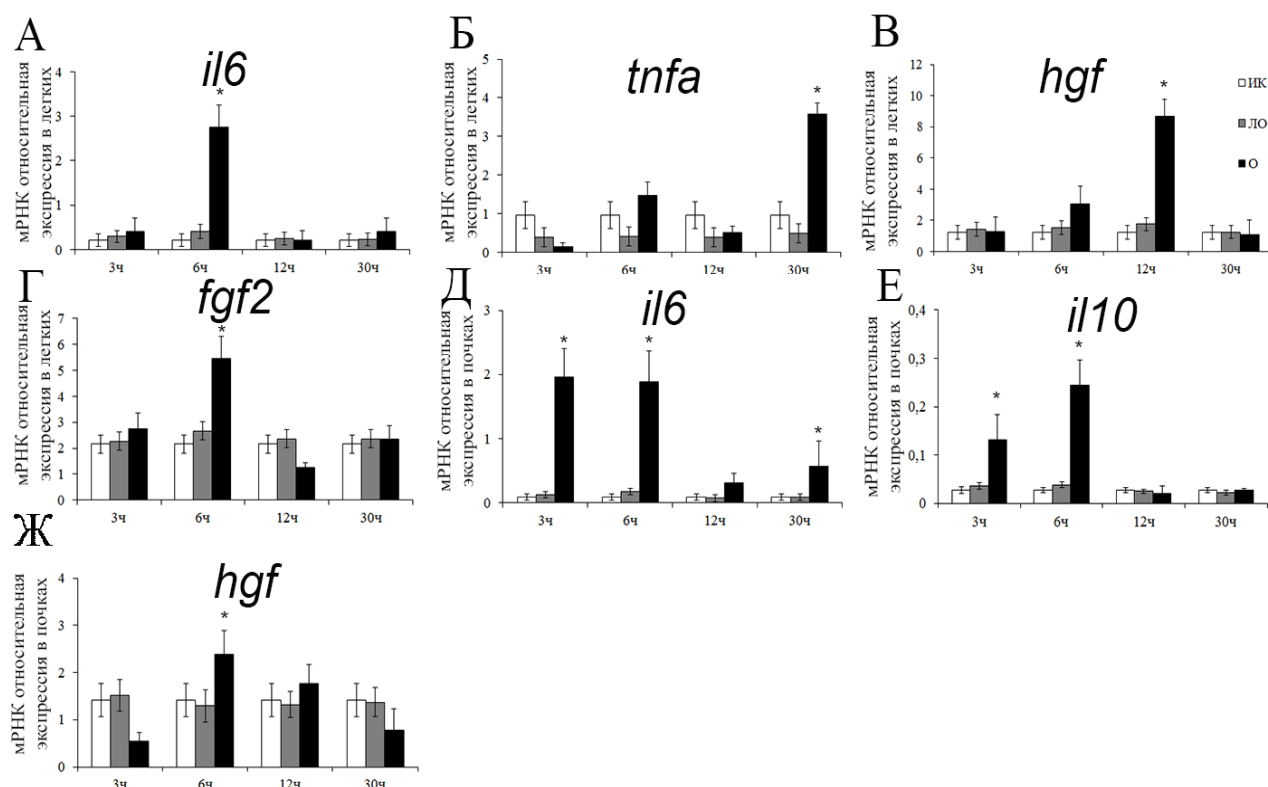


Рис. 10. Экспрессия генов сигнальных молекул в легких (А,Б,В,Г) и почках (Д,Е,Ж) после субтотальной резекции печени крыс. По оси абсцисс – срок после операции, по оси ординат – относительная экспрессия генов. Белые столбики – интактный контроль, серые столбики – ложнооперированные животные, черные – опыт, данные представлены в виде средних и доверительных интервалов, * - статистически значимые различия между оперированными и ложно оперированными животными ($p < 0,05$).

Низкое содержание HGF приводило к компенсаторной индукции в легких и почках экспрессии гена *hgf* и *tnfa* с 3 по 30 ч после субтотальной резекции печени то есть в период, предшествующий началу пролиферации гепатоцитов (Рис. 10 б,в,ж). Исходя из этого, возможно, значительная часть TNFα и HGF, необходимая для пролиферации гепатоцитов образуется за пределами печени. На это также указывает увеличение содержания HGF в почках и легких. При этом в легких происходило постепенное нарастание количества HGF, тогда как в почках - резкое нарастание HGF к 6 ч, а потом резкое снижение, что свидетельствует о его поступлении в кровь.

Кроме того, в печени с 3 по 30 ч после субтотальной резекции обнаружено повышение экспрессии генов фактора роста фибробластов 2 - *fgf2*, который является митогеном для гепатоцитов [Michalopoulos G.K., 2014], и гена *fn14* – рецептора TWEAK-сигнального пути, который, видимо, также участвует в регуляции пролиферации гепатоцитов [Karaca G. et al., 2014]. Полученные данные свидетельствуют о том, что, вероятно, при резком

снижении HGF стимуляция пролиферации гепатоцитов происходит за счет других факторов, в том числе FGF2 и TWEAK-сигнального пути.

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ ПОСЛЕ СУБТОТАЛЬНОЙ РЕЗЕКЦИИ

После субтотальной резекции печени крыс на всех сроках исследования CK19 экспрессировался в эпителии желчных протоков. С 2 по 5 сутки после операции доля CK19+ клеток в регенерирующей печени статистически значимо повышалась по сравнению с контролем, через 7-10 суток после воздействия доля CK19+ не отличалась от контроля (Рис.11). 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.

При изучении экспрессии SOX9 в регенерирующей печени у контрольных животных данный белок определялся исключительно в ядрах холангиоцитов (Рис.12а). Через 1 сутки после резекции выявлялись единичные SOX9+ гепатоциты. Наибольшее количество таких клеток определялось через 2 и 7 суток после субтотальной резекции печени крыс (Рис.12 б,в), за счет чего в эти сроки и увеличивался индекс SOX9+клеток (Рис.13а). Достоверное увеличение количества белка SOX9 в печени по сравнению с контролем происходило через 2 и 7 суток после операции (Рис.13 б,в).

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]. На связь экспрессии SOX9 и пролиферации гепатоцитов указывает совпадение пиков митотического индекса гепатоцитов и времени, когда в регенерирующей печени появляется наибольшее количество гепатоцитов, экспрессирующих SOX9. Возможно, экспрессия SOX9 в гепатоцитах отражала их подготовку к масштабной и длительной пролиферации.

Активность стволовых клеток печени предположительно регулируется TWEAK- и NOTCH-сигнальными путями [Yanger K. et al., 2013, Karaca G. et al., 2014]. Статистически значимое повышение экспрессии гена *fn14* отмечалось через 0,5-48 ч после резекции, а гена *tweak* - через 5 и 7 суток после воздействия (Рис.5з, Рис. 6г). При иммуногистохимическом исследовании рецептор Fn14 в печени контрольных животных слабо

экспрессировался в холангиоцитах и в гепатоцитах. 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 и пролиферации прогениторных клеток печени, но и в митотическом делении гепатоцитов [Han S. et al., 2003, Karaca G. et al., 2014].

Помимо TWEAK-сигнального пути 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-сигнальному пути, при этом показано, что ключевой ген этого молекулярного каскада *yap* также является NOTCH-зависимым геном [Yimlamai D. et al., 2014]. Гены рецепторов *notch1* и *notch2* NOTCH-сигнального пути экспрессировались на более низком уровне, чем у контрольных крыс (Рис.25 а,б). Активность *notch1* у подопытных животных уменьшалась по сравнению с контролем через 12, 48 ч, а также в период 3-10 суток после операции (Рис.25а), активность *notch2* была снижена в период 0,5 -12 ч после резекции печени (Рис.25 б). Кроме классических NOTCH-зависимых генов через 30 мин, 7 и 10 суток после субтотальной резекции происходит статистически значимое снижение активности *yap* ($p<0,05$), который также является NOTCH-зависимым геном, однако еще относится к Hippo-сигналинг, регулирующий дифференцировку гепатоцитов и холангиоцитов [Yimlamai D. et al., 2014]. Экспрессия гена *yap* ни на одном из сроков не увеличивалась (Рис.25г).

Локализация CK19+ клеток только в составе желчных протоков, а также отсутствие клеток с промежуточным фенотипом, сниженная экспрессия генов *notch1*, *notch2* и *yap1* свидетельствуют об отсутствии активации прогениторных клеток печени и трансдифференцировки гепатоцитов в холангиоциты [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 свидетельствует, видимо, о подготовке гепатоцитов к масштабной и длительной пролиферации.

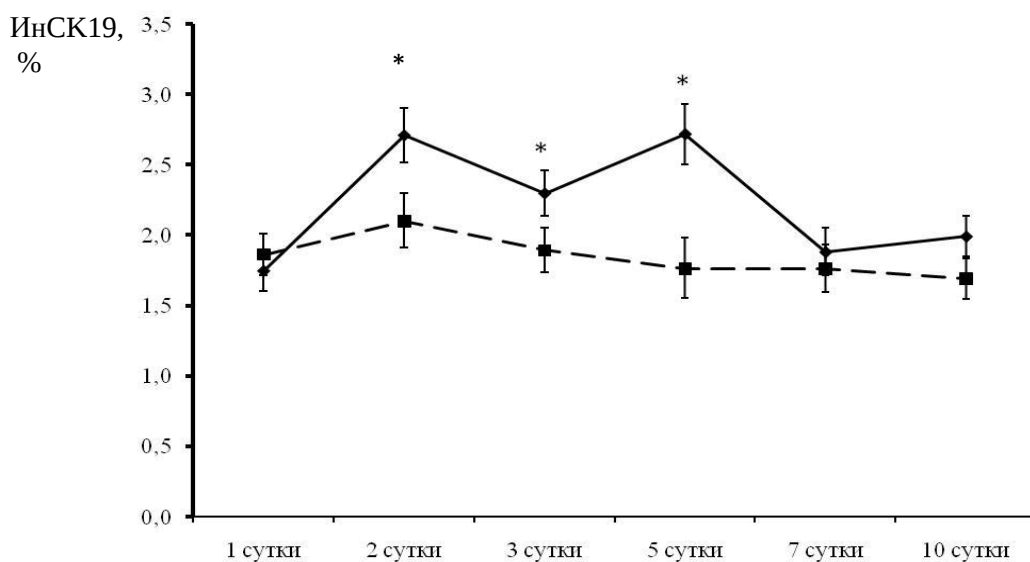


Рис.11 Динамика клеток, экспрессирующих цитокератин 19 (СК19) в печени крыс после субтотальной резекции, по оси абсцисс – срок после операции в сутках, по оси ординат – индекс СК19-позитивных клеток в %, данные представлены в виде средних значений и доверительных интервалов, непрерывная линия – оперированные животные, пунктирная – ложно оперированные, * - статистически значимые различия между оперированными и ложно оперированными животными ($p < 0,05$).

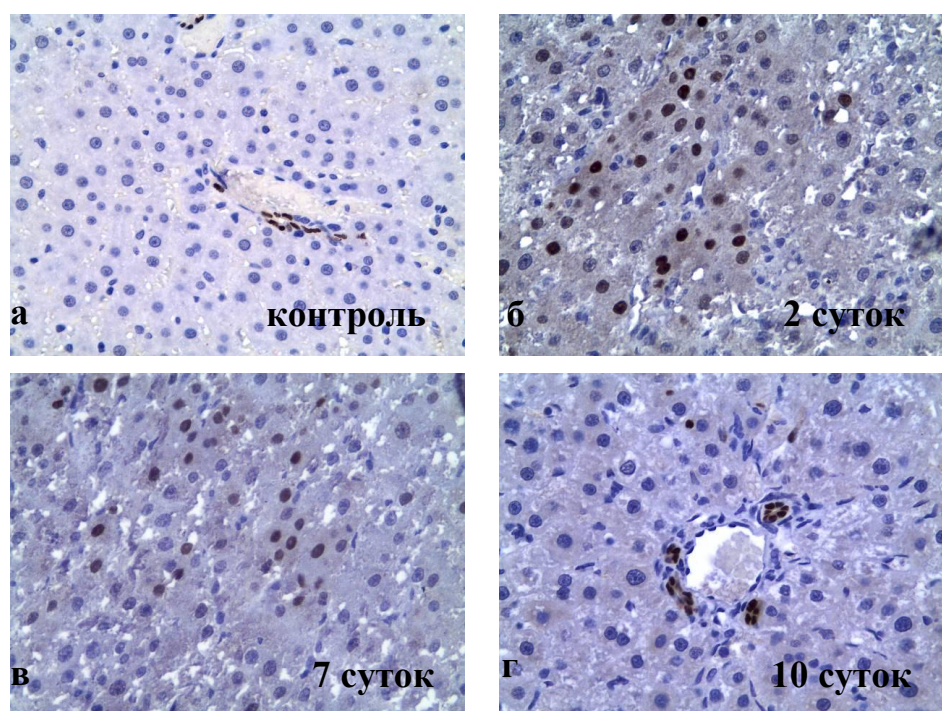


Рис.12 Экспрессия SOX9 в печени крыс после субтотальной резекции, иммуногистохимическое исследование: а – интактный контроль, б – 2 суток после субтотальной резекции, в – через 7 суток после субтотальной резекции, г – 10 суток после субтотальной резекции.

г – через 10 суток после субтотальной резекции, ядра докрашены гематоксилином, $\times 400$.

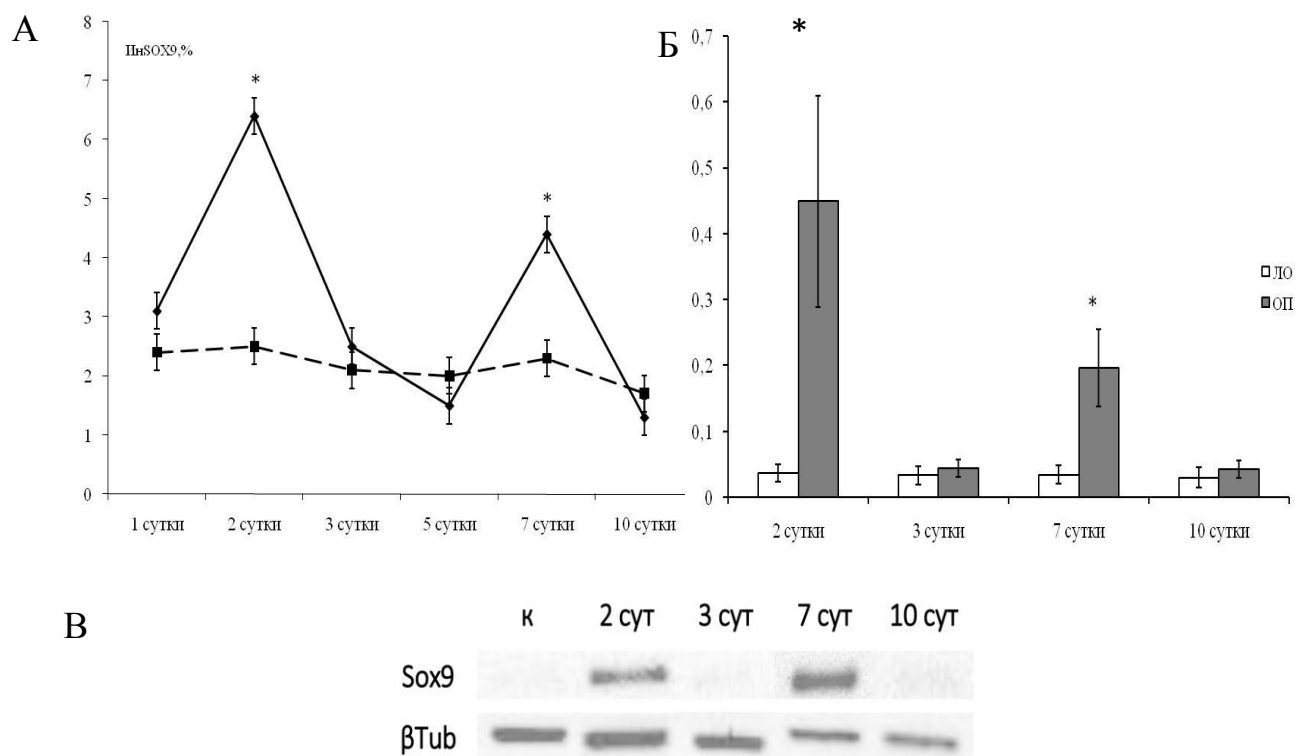


Рис. 13. Динамика экспрессии белка SOX9 в печени крыс после субтотальной резекции. А. Динамика клеток, экспрессирующих SOX9, по оси абсцисс – срок после операции в сутках, по оси ординат – индекс SOX9-позитивных клеток в %, непрерывная линия – оперированные животные, пунктирная – ложно оперированные. Б. Денситометрический анализ вестерн-блота SOX9. По оси абсцисс – время после операции, по оси ординат – относительная экспрессия белка. Белые столбики – ложно оперированные (ЛО), серые – оперированные (ОП). В. Вестерн-блот белка SOX9. Данные представлены в виде средних значений и доверительных интервалов * - статистически значимые различия между оперированными и ложно оперированными животными ($p < 0,05$).

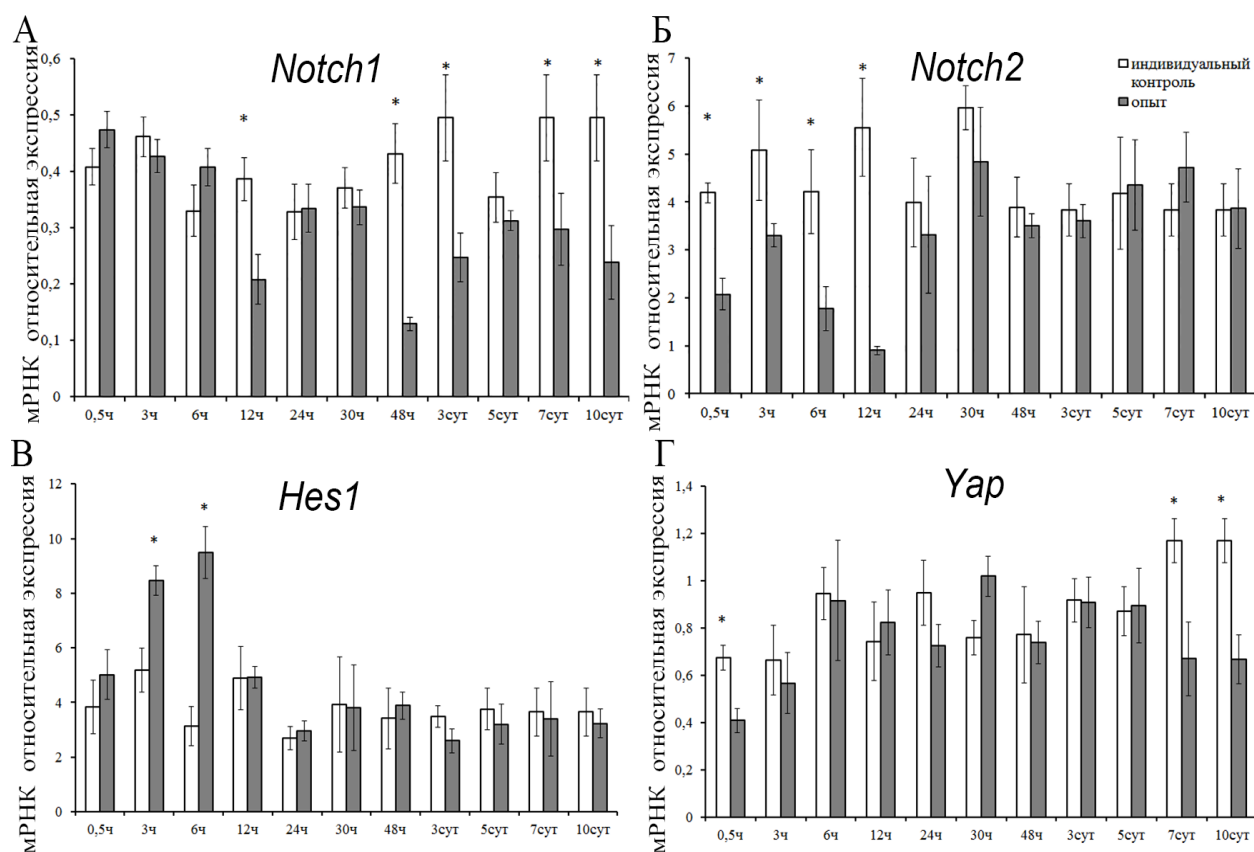


Рис.14. Экспрессия генов NOTCH-сигнального пути в печени крыс после субтотальной резекции. По оси абсцисс – срок после операции, по оси ординат – относительная экспрессия генов. Белые столбики – индивидуальный контроль, серые столбики – опыт, данные представлены в виде средних и доверительных интервалов, * - статистически значимые различия между оперированными и индивидуальным контролем ($p < 0,05$).

ХАРАКТЕРИСТИКА СИСТЕМЫ МАКРОФАГОВ ПЕЧЕНИ КРЫС ПОСЛЕ СУБТОТАЛЬНОЙ РЕЗЕКЦИИ

CD68+ макрофаги в печени контрольных животных представляют довольно многочисленную популяцию клеток печени, 20% ядер в поле зрения принадлежало CD68+клеткам (Рис.15а). После резекции 80% в печени крыс, количество CD68+ клеток статистически значимо возросло через 1 сут после резекции и оставалось повышенным по сравнению с контролем до 10 суток после операции включительно ($p < 0,05$, Рис.15а, Рис.16а). При этом все макрофаги относились к популяции резидентных, поскольку ни в одном из сроков после субтотальной резекции печени клетки, экспрессирующие белок CX3CR1, который является маркером макрофагов, производных моноцитов крови не выявляли. Это отличает регенеративный процесс в печени после резекции от репарации после токсического повреждения,

вызванного CCL4, парацетамолом и др., когда в печень мигрируют моноциты крови [You Q. et al., 2013, Zigmond E. et al., 2014].

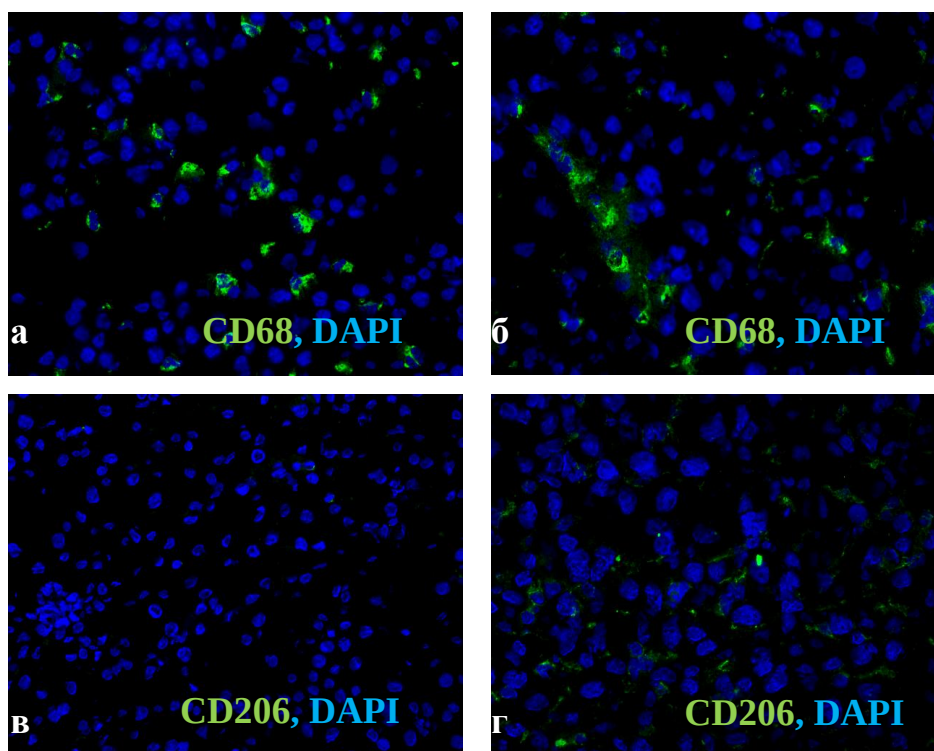


Рис.15. Динамика общего количества макрофагов (CD68+) и прорегенераторных макрофагов (CD206+) в печени крыс после субтотальной резекции. Иммуногистохимическое исследование экспрессии маркеров макрофагов: а – экспрессия CD68 в печени контрольных животных, б - экспрессия CD68 в печени подопытных крыс через 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, $\times 400$

Наращение 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 ч после операции, митотический индекс составил $4,5 \pm 1,8\%$. Ни на более ранних сроках, ни на более поздних митозы среди макрофагов не встречались.

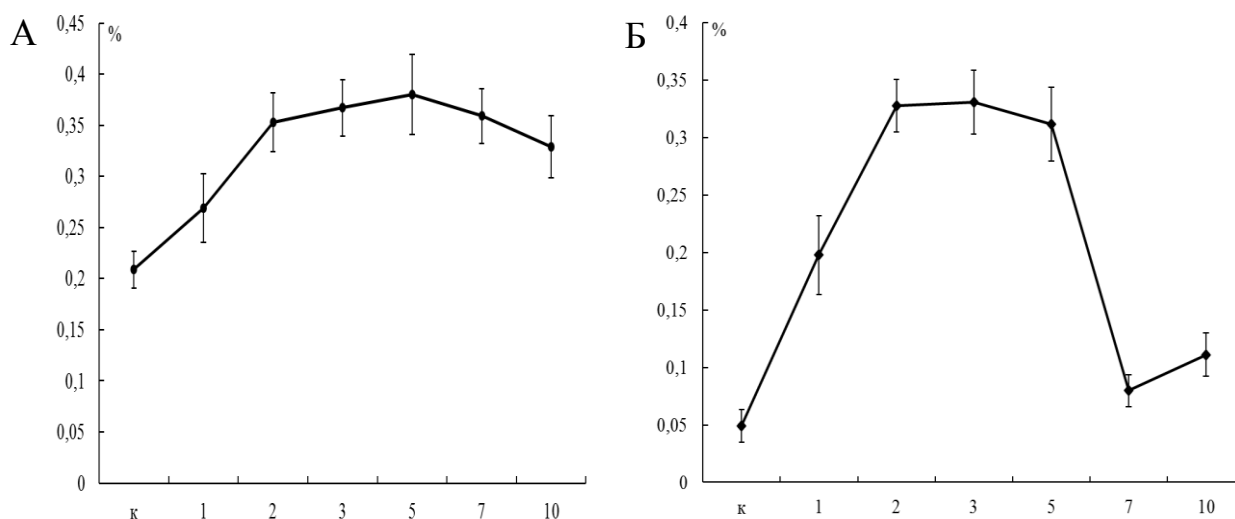


Рис.16. Динамика популяции макрофагов печени после субтотальной резекции. А – динамика CD68+ макрофагов, Б – динамика CD206+ макрофагов, по оси абсцисс - время после операции в сутках, полосы погрешности – доверительные интервалы.

M2-макрофаги в печени выявляли с помощью антител к маркеру CD206. У контрольных животных в популяции макрофагов печени CD206+ клетки практически отсутствовали (Рис.15в, Рис. 16б). Однако через 1 сутки после резекции количество CD206+клеток резко возрастало по сравнению с контролем (Рис.15г, Рис.16б). Обе популяции клеток (CD68+и CD206+) локализовались около синусоидов печени. Наибольшее количество CD206+ макрофагов в регенерирующей печени выявлялось через 2, 3, 5 суток после операции, а затем оно резко снижалось, но не достигало контрольного показателя ($p < 0,05$, Рис.16б).

Субтотальная резекция печени крыс вызывала изменение состояния общей популяции макрофагов печени, это выражалось в активации экспрессии генов ряда цитокинов, а также в увеличении общего количества макрофагов в печени и появлении среди них субпопуляции клеток, экспрессирующих CD206. При регенерации печени источником прорегенераторных макрофагов, экспрессирующих CD206, очевидно, является исключительно резидентные макрофаги печени – клетки Купфера, поскольку в печени отсутствуют клетки, экспрессирующие CXCR1, который является маркером макрофагов - производных моноцитов.

ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУНОФЕНОТИПА И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ МСК ПУПОЧНОГО КАНАТИКА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Прикрепившиеся к пластику клетки, выделенные из пупочного канатика (Вартонова студня) крыс, имеют на своей поверхности маркеры мультипотентных стромальных клеток CD73, CD90 и CD105 и не

экспрессируют маркеры гемопоэтических клеток CD45, CD34, CD11b, CD19. Клеточные культуры МСК, выделенные из пупочного канатика крысы, дифференцировались в 3 различных направлениях: адипогенном, остеогенном и хондрогенном.

СТИМУЛЯЦИЯ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ КРЫС ПОСЛЕ СУБТОТАЛЬНОЙ РЕЗЕКЦИИ С ПОМОЩЬЮ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МСК ПУПОЧНОГО КАНАТИКА

После субтотальной резекции во всех группах гибель животных отмечалась в течение первых трех суток после операции, что, по-видимому, связано не только с развивающейся печеночно-клеточной недостаточностью, но и с тяжестью хирургической операции. Исходя из этого, выживаемость животных определяли в период первых трех суток после операции. После введения МСК пупочного канатика отмечалось статистически значимое снижение смертности среди оперированных животных ($p < 0,05$), по сравнению с контрольной группой.

У животных опытной группы без и с введением МСК масса печени восстанавливалась через 10 суток после операции. Несмотря на одинаковую скорость восстановления массы печени, трансплантация МСК стимулировала пролиферацию гепатоцитов в ранние сроки регенераторного процесса (Рис.17а,б).

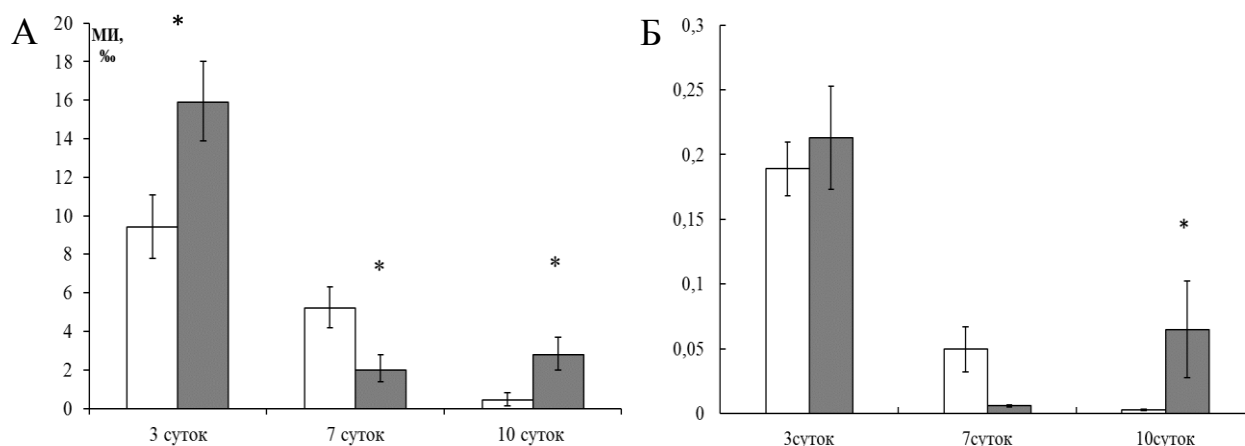


Рис. 17. Влияние трансплантации МСК пупочного канатика на пролиферацию гепатоцитов в регенерирующей печени крыс после субтотальной резекции. А. Митотический индекс, по оси ординат – митотический индекс (МИ) в %. Б. Индекс Ki-67, по оси ординат индекс Ki-67 (Ин Ki-67). Белые столбики – показатель пролиферации гепатоцитов в печени крыс после субтотальной резекции без трансплантации МСК с введением 0,9% раствора NaCl, серые – с трансплантацией МСК пупочного канатика. По оси абсцисс – время после операции в сутках. Данные представлены в виде средних с доверительными интервалами, *-

статистически значимые отличия по сравнению с животными, которым не трансплантировали МСК, $p < 0,05$.

ИЗУЧЕНИЕ МИГРАЦИИ, ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И ЭЛИМИНАЦИИ ТРАНСПЛАНТИРОВАННЫХ МСК ПУПОЧНОГО КАНАТИКА ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ КРЫС ПОСЛЕ СУБТОТАЛЬНОЙ РЕЗЕКЦИИ

Меченые МСК после трансплантации обнаруживали в селезенке во все сроки исследования. Через 3 суток визуализировались треки введения – скопления меченых клеток в местах инъекций. Через 7 и 10 суток меченые МСК обнаруживались преимущественно в красной пульпе селезенки, где они располагались диффузно. Единичные клетки, несущие метку РКН 26, локализовались в белой пульпе. МСК после трансплантации в селезенку были способны мигрировать в печень, но в очень ограниченном количестве. Через 3 суток после трансплантации в печени уже обнаруживали меченые клетки, при этом они лежали чаще всего одиночно. Наибольшее число меченых клеток в печени выявляли через 7 суток после трансплантации, при этом клетки располагались группами от 1 до 4. Через 10 суток после субтотальной резекции количество клеток уменьшались по сравнению с предыдущим сроком, меченые клетки располагались одиночно.

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].

Получены в работе данные, свидетельствующие о том, что трансплантированные МСК пупочного канатика не экспрессировали цитокератин 18 (маркер гепатоцитов) и цитокератин 19 (маркер холангиоцитов). Охарактеризована способность МСК дифференцироваться в клетки стромы. Введенные клетки не экспрессировали α -гладкомышечный актин, то есть не дифференцировались в гладкие миоциты или миофибробласты. Однако на 3 и 10 сутки обнаруживались единичные клетки, меченные РКН26, и несущие маркер эндотелиоцитов CD31. Способность МСК дифференцироваться в направлении фенотипа эндотелиоцитов подтверждена *in vitro* при сокультивировании с культурой эндотелиальных клеток (ЭК) в матригле.

При иммуногистохимическом исследовании часть меченых клеток реагировали с антителами к маркеру макрофагов CD68, что свидетельствует о фагоцитозе макрофагами меченых МСК или фрагментов их мембран. В селезенке через 24 ч после трансплантации $83,2 \pm 4,6\%$ РКН26-

положительных клеток окрашивалась антителами к CD68. Через 3 суток почти 100% трансплантированных клеток являлись CD68-позитивными ($p < 0,05$). В печени через 3 суток после трансплантации $96,8 \pm 2,2\%$ меченых клеток имели фенотип PKN26+CD68+. Через 10 суток доля меченых клеток, окрашенных с помощью антител к маркеру макрофагов, не изменялась и составляла $96,3 \pm 2,6\%$ ($p > 0,05$). Как следует из полученных результатов, элиминация аллогенных МСК происходит с большей по сравнению с печенью 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 эффективный для доставки клеток в поврежденную печень [Li J. et al., 2011, Sun S. et al., 2013].

ВЛИЯНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МСК ПУПОЧНОГО КАНАТИКА НА СООТНОШЕНИЕ ТИПОВ МАКРОФАГОВ В РЕГЕНЕРИРУЮЩЕЙ ПЕЧЕНИ КРЫС ПОСЛЕ СУБТОТАЛЬНОЙ РЕЗЕКЦИИ

Анализ литературных данных позволил выдвинуть предположение о том, что в основе способности МСК регулировать иммунный ответ лежит их способность переключать M1- классически активированный, провоспалительный тип макрофагов на M2-альтернативно активированный, противовоспалительный [Proctor D.J., 2013]. При трансплантации МСК пупочного канатика крысам в печень после субтотальной резекции через 7 суток после операции происходило статистически значимое снижение общего количества макрофагов, экспрессирующих CD68 (Рис.18а). При этом в печени крыс, которым вводили МСК достоверно повышалось количество прорегенераторных M2-макрофагов, которые экспрессируют CD206 (Рис.18б). Таким образом, полученные данные согласуются с результатами исследований, в которых была показана способность МСК в ходе репаративного процесса модулировать популяционный состав тканевых макрофагов.

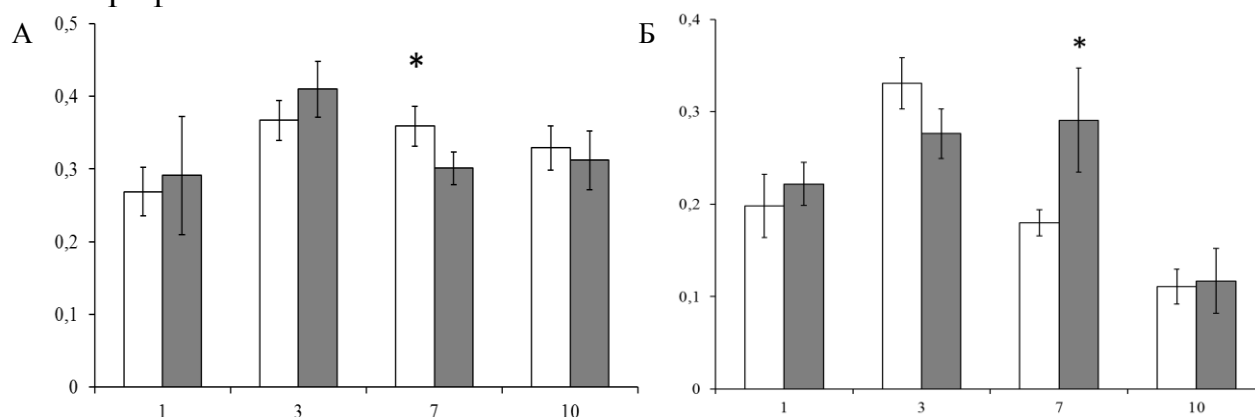


Рис. 18. Система макрофагов регенерирующей печени крыс после субтотальной резекции при трансплантации МСК пупочного канатика. А. Динамика CD68+ макрофагов. Б. Динамика CD206+ макрофагов. Белые

столбики – доля макрофагов в печени крыс без трансплантации МСК с введением 0,9% раствора NaCl, серые – с трансплантацией 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, $p < 0,05$

ВЛИЯНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МСК ПУПОЧНОГО КАНАТИКА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ РЕГУЛЯТОРНЫХ МОЛЕКУЛ В РЕГЕНЕРИРУЮЩЕЙ ПЕЧЕНИ КРЫС ПОСЛЕ СУБТОТАЛЬНОЙ РЕЗЕКЦИИ

Возможным проявлением паракринного действия МСК является иммуномодулирующий эффект [Proskor D.J., 2013]. Предполагают, что МСК влияют на поляризацию активированных макрофагов [Фатхудинов Т.Х. и соавт., 2013]. После субтотальной резекции печени в условиях трансплантации МСК пупочного канатика изменение экспрессии генов цитокинов, продуцируемых M1- и M2- субпопуляциями макрофагов, а также генов факторов роста не 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.

ВЛИЯНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МСК ПУПОЧНОГО КАНАТИКА НА АКТИВНОСТЬ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ КРЫС ПОСЛЕ СУБТОТАЛЬНОЙ РЕЗЕКЦИИ

Трансплантированные клетки могут стимулировать 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].

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% раствор NaCl. Резкое увеличение количества CK19+клеток за пределами желчных протоков не происходило. Через 7 суток у подопытных животных обнаружили большое количество гепатоцитов, экспрессирующие в ядрах SOX9, при этом нет различий между животными с трансплантацией МСК и без нее. 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.

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 [Vallabhaneni K.C. et al., 2012].

Исследовано состояние энергетического обмена в гепатоцитах печени после субтотальной резекции при трансплантации МСК пупочного канатика и без введения клеток. 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. 19а). В течение первой недели после операции содержание митохондрий в ткани печени не восстанавливалось до исходного уровня ни в одной из групп (Рис.19а). Однако в группе животных с введением МСК на 7 сутки после резекции содержание митохондриального белка достоверно выше, чем в группе сравнения ($p < 0,05$, Рис.19б), что свидетельствует о более быстром увеличении количества митохондрий у животных, получивших инъекции МСК.

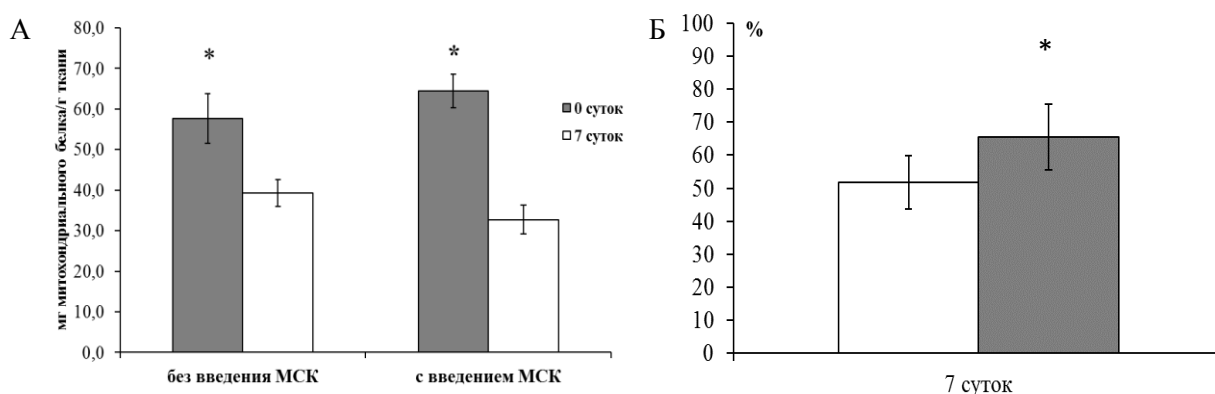


Рис. 19. Количество митохондриальных белков в ткани печени у крыс с трансплантацией МСК и без нее. А – содержание митохондриальных белков на 1 г ткани печени; Б - количество митохондриальных белков на 1 г ткани на 7 сутки после субтотальной резекции, % от исходного количества, данные представлены средние значения и стандартные ошибки средних, белые столбики – без трансплантации МСК, серые – с трансплантацией МСК, * - статистически значимые различия по сравнению с соответствующим контролем, $p < 0,05$

На 7-ые сутки после операции у животных с трансплантацией МСК содержание цитохромов аа3, b и с на 1 г ткани печени не отличалось от интактной печени, у животных без имплантации МСК количество цитохромов остается сниженным по сравнению с интактными животными ($p < 0,05$, Рис. 20). На 7-ые 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 ($p<0,05$, Рис.20).

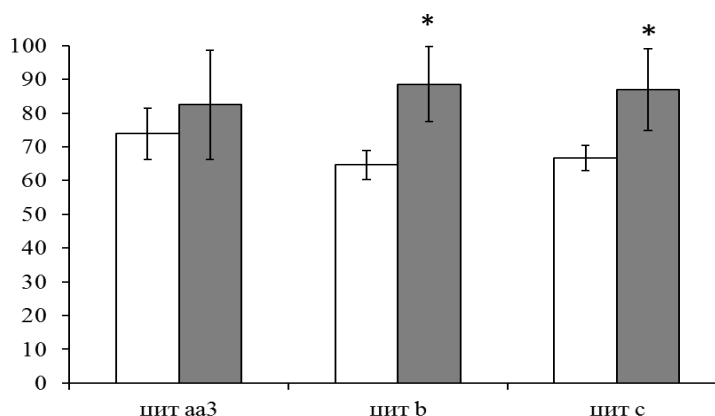


Рис. 20. Доля от исходного содержания цитохромов в 1 г ткани на 7 сутки после субтотальной резекции печени без трансплантации МСК и с ней, белые столбики – без трансплантации МСК, серые – с трансплантацией МСК. * - статистически значимые различия по сравнению с соответствующим контролем, $p<0,05$

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.21 а,б). В то же время содержание цитохрома aa3 на 7 сутки было повышено только у животных без введения МСК (Рис.21а).

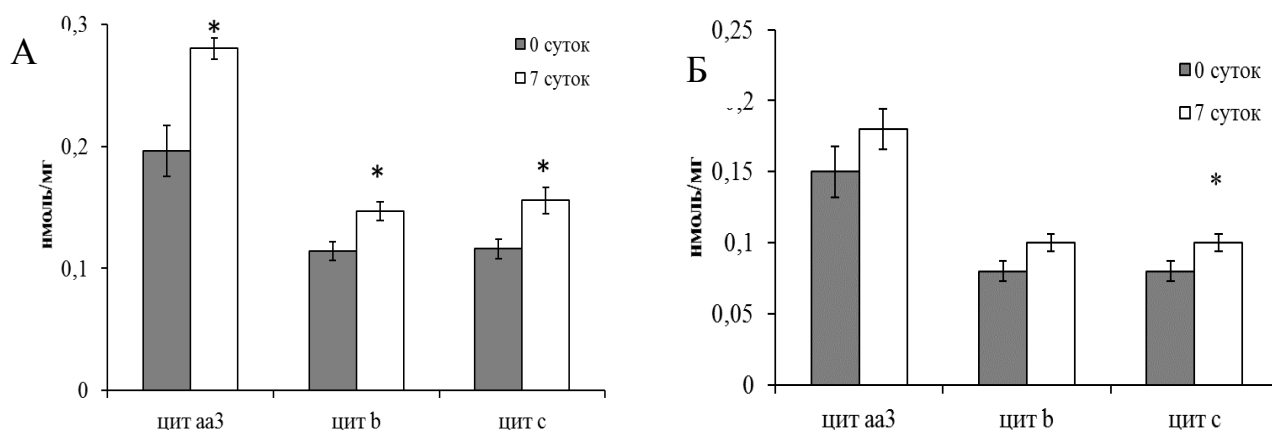


Рис. 21. А – содержание цитохромов c, в и aa3 в митохондриях печени контрольных крыс; Б - содержание цитохромов c, в и aa3 в митохондриях печени крысы после субтотальной резекции с трансплантацией МСК; * - статистически значимые различия по сравнению с соответствующим контролем, $p<0,05$

При сравнении показателей скорости митохондриального дыхания клеток печени у животных с внутриселезеночной трансплантации МСК на 7 сутки после операции достоверных отличий от исходных показателей не было (Рис. 22а). 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. 22б). Также увеличивались 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. 22б). При этом отношение скоростей сопряженного дыхания к максимальной скорости несопряженного дыхания не изменялось. Следовательно, увеличение скорости дыхания не связано с нарушением целостности 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. 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. В группе без введения МСК, для которой было зарегистрировано увеличение скорости митохондриального дыхания, содержание митохондрий и цитохромов в ткани печени восстанавливалось медленнее, чем у группы животных с введением МСК, в которой не наблюдалось увеличения скорости дыхания.

Сопоставление всех полученных данных позволяет предположить, что через неделю после проведения субтотальной гепатэктомии в обеих группах наблюдалось два разных этапа регенерации ткани. Печень животных группы сравнения еще находится 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]. В печени животных, которым трансплантировали МСК, регенераторный процесс, по-видимому, уже завершается, что сопровождается нормализацией митохондриальной функции.

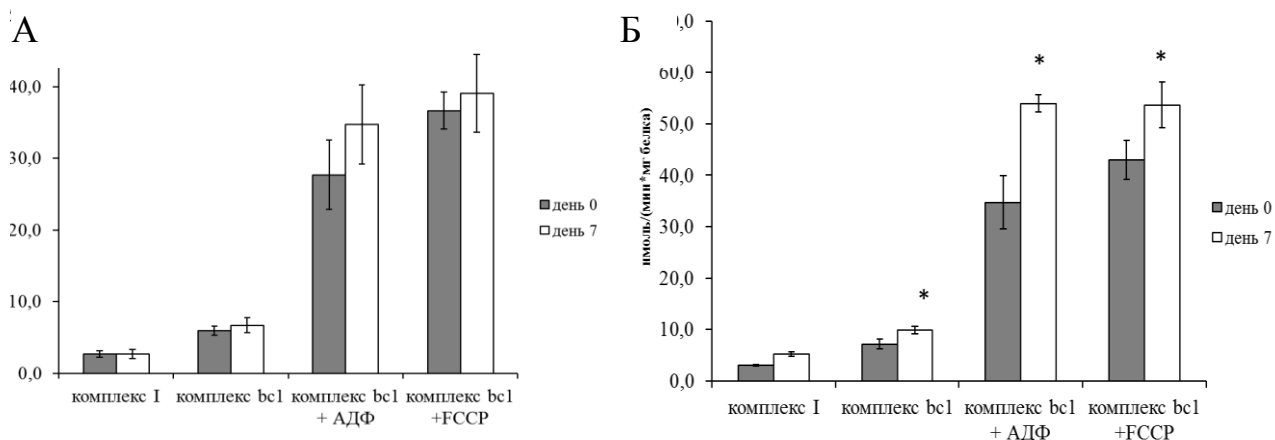


Рис.22. Содержание цитохромов аа3, b, c и скорость митохондриального дыхания в ткани печени.

А – скорость митохондриального дыхания в присутствии субстратов разных комплексов дыхательной цепи у животных с трансплантацией МСК, Б – без введения МСК: 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, $p < 0,05$.

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, стимулировала пролиферацию гепатоцитов, повышала 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.

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 Ki-67 и митотических делений гепатоцитов в течение 30 ч 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 ч) повышается экспрессия генов *il6*, *il10*, *inos*, *mmp9*, *fgf2*, *tgfb*, *fn14*, *sox9* и в поздней (7-е сутки) - генов *il1b*, *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 цитokerатин 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.

Связь работы с научными программами

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом НИР Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека» (номер государственной регистрации – 1201158018), а также при финансовой поддержке гранта ФЦП (Соглашение № 8718 от 09.10.2012.), РФФИ (Соглашение 14-04-01224 от 26 декабря 2013 года) и гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых (№ 14.120.14.6239 от 3 февраля 2014 года).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, входящих в Перечень РФ рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и ученой степени доктора наук

1. Влияние мультипотентных стромальных клеток на функцию митохондрий клеток регенерирующей печени / **Ельчанинов А.В.**, Володина М.А., Арутюнян И.В., Макаров А.В., Тарасова Н.В., Кананыхина Е.Ю., Усман Н.Ю., Марей М.В., Высоких М.Ю., Глинкина В.В., Большакова Г.Б., Фатхудинов Т.Х., Сухих Г.Т. // Клеточные технологии в биологии и медицине. - 2014. - № 4. - С. 253-259.
2. Elimination of allogeneic multipotent stromal cells by host macrophages in different models of regeneration. / Arutyunyan I., **Elchaninov A.**, Fatkhudinov T., Makarov A., Kananykhina E., Usman N., Sukhikh G., Bolshakova G., Glinkina V., Goldshtein D. // International Journal of Clinical and Experimental Pathology. – 2015. – V. 8. – № 5. – P. 4469-4480.
3. Экспрессия генов цитокинов и факторов роста в печени после субтотальной резекции у крыс. / **Ельчанинов А.В.**, Фатхудинов Т.Х., Кананыхина Е.Ю., Усман Н.Ю., Арутюнян И.В., Макаров А.В., Большакова Г.Б., Сухих Г.Т. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2016. - № 3. - С. 373-377.
4. Экспрессия генов цитокинов и факторов роста в печени после субтотальной резекции у крыс. / **Ельчанинов А.В.**, Фатхудинов Т.Х., Кананыхина Е.Ю., Усман Н.Ю., Арутюнян И.В., Макаров А.В., Быков А.В., Большакова Г.Б., Сухих Г.Т. // Гены и клетки. - 2016. - № 1. - С. 61-67.
5. Роль прогениторных клеток в регенерации печени после субтотальной резекции. / **Ельчанинов А.В.**, Фатхудинов Т.Х., Кананыхина Е.Ю., Усман Н.Ю., Арутюнян И.В., Макаров А.В., Быков А.В., Большакова Г.Б., Сухих Г.Т. // Клеточные технологии в биологии и медицине. - 2016. - № 1. - С. 18-25.
6. Активность генов NOTCH-сигнального пути и NOTCH-зависимых генов в печени крыс после субтотальной резекции / **Ельчанинов А.В.**, Фатхудинов Т.Х., Усман Н.Ю., Арутюнян И.В., Кананыхина Е.Ю., Макаров А.В., Большакова Г.Б., Сухих Г.Т. // Гены и клетки. – 2016. – Т. 9. – № 3 – С. 45-52.
7. Элиминация РКН26-меченных МСК при аллогенной трансплантации. / Арутюнян И.В., **Ельчанинов А.В.**, Фатхудинов Т.Х., Макаров А.В., Кананыхина Е., Большакова Г.Б., Глинкина В.В., Гольдштейн Д.В., Сухих Г.Т. // Гены и клетки. – 2014. – Т. 9. – № 3-А. – С. 45-52.
8. Динамика количества М2-макрофагов при регенерации печени крыс **Ельчанинов А.В.**, Фатхудинов Т.Х., Усман Н.Ю., Арутюнян И.В.,

Кананыхина Е.Ю., Макаров А.В., Большакова Г.Б., Сухих Г.Т. // молекулярная медицина. – 2017. – № 1 – С. 45-50.

9. Пролиферация и клеточная гибель гепатоцитов после субтотальной резекции печени крыс / **Ельчанинов А.В.**, Фатхудинов Т.Х., Арутюнян И.В., Кананыхина Е.Ю., Макаров А.В., Большакова Г.Б., Сухих Г.Т. // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2016. – № 3 – С. 22-30.

10. Ангиогенный потенциал мультипотентных стромальных клеток пупочного канатика: исследование in vitro. / Арутюнян И.В., Кананыхина Е.Ю., Фатхудинов Т.Х., **Ельчанинов А.В.**, Макаров А.В., Раимова Э.Ш., Большакова Г.Б., Сухих Г.Т. // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2016. – № 1. – С. 3-12

11. Molecular survey of cell source usage during subtotal hepatectomy-induced liver regeneration in rats // **Elchaninov A**, Fatkhudinov T, Usman N, Kananykhina E, Arutyunyan I, Makarov A, Bolshakova G, Goldshtein D, Sukhikh G. // PLoS One. – 2016. - Sep 15;11(9):e0162613. doi: 10.1371/journal.pone.0162613.

12. Umbilical Cord as Prospective Source for Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy. / Arutyunyan I., **Elchaninov A.**, Makarov A., Fatkhudinov T. // Stem Cells International. – 2016. – V. 2016.– article ID 6901286, 17 pages.

Другие публикации

13. Регенерация печени млекопитающих / **Ельчанинов А.В.**, Фатхудинов Т.Х., Макаров А.В., Глинкина В.В., Большакова Г.Б. // Клиническая и экспериментальная морфология. — 2012.— № 4.— с.57-61

14. Влияние мультипотентных стромальных клеток пупочного канатика на регенерацию печени после субтотальной резекции / **Ельчанинов А.В.**, Фатхудинов Т.Х., Кананыхина Е.Ю., Арутюнян И.В., Макаров А.В. // Материалы I Национального конгресса по регенеративной медицине, 4-6 декабря 2013

15. Multipotent stromal cells injection improves rat liver regeneration through activation of mitochondrial functions after subtotal hepatectomy / **Elchaninov A.**, Volodina M., Fathudinov T. // Joint IUBMB/MiP Symposium on Mitochondrial Physiology – a Point/Counterpoint Meeting, 8-12 Sept., 2014, Austria

16. Роль резидентных прогениторных клеток в регенерации печени после субтотальной резекции / **Ельчанинов А.В.**, Фатхудинов Т.Х., Кананыхина Е.Ю., Арутюнян И.В., Макаров А.В., Усман Н.Ю. // Материалы II Национального конгресса по регенеративной медицине, 3-5 декабря 2015

17. Динамика M2-макрофагов при регенерации печени крыс после субтотальной резекции / **Ельчанинов А.В.**, Фатхудинов Т.Х., Кананыхина Е.Ю., Арутюнян И.В., Макаров А.В., Усман Н.Ю. // Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии Москва, 6-7 апреля 2016 года